



HAL
open science

Rôle de la phosphatase alcaline non spécifique du tissu "TNAP" dans la calcification des plaques d'athérosclérose

Lynn Kawtharany

► **To cite this version:**

Lynn Kawtharany. Rôle de la phosphatase alcaline non spécifique du tissu "TNAP" dans la calcification des plaques d'athérosclérose. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1015 . tel-03942922

HAL Id: tel-03942922

<https://theses.hal.science/tel-03942922v1>

Submitted on 17 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.



N° d'ordre NNT : 2022LYSE1015

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de

L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N° 205

École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS)

Spécialité de doctorat : Biochimie

Soutenue publiquement le 02/02/2022, par :

KAWTHARANY Lynn

Rôle de la phosphatase alcaline non spécifique du tissu « TNAP » dans la calcification des plaques d'athérosclérose

Devant le jury composé de :

BECK-CORMIER Sarah	Chargée de recherche INSERM	INSERM-Nantes	Rapporteur
KAMEL Saïd	Professeur des Universités	Université Picardie Jules Verne-Amiens	Rapporteur
LAFAGE-PROUST Marie-Hélène	Professeur des Universités	Université Jean Monnet Saint-Etienne	Rapporteur
CANET-SOULAS Emmanuelle	Professeur des Universités	Université Lyon 1	Examinatrice
KEMPF Hervé	Chargé de recherche INSERM	INSERM-Nancy	Examineur
MAGNE David	Professeur des Universités	Université Lyon 1	Directeur
BESSUEILLE Laurence	Maître de conférences	Université Lyon 1	Co-directrice
ZIBARA Kazem	Professeur des Universités	Université Libanaise	Co-directeur
HAMADE Eva	Maître de conférences	Université Libanaise	Invitée

Université Claude Bernard –LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	Mme Céline BROCHIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directeur : M Claude DUSSART
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Directeur : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Métabolisme, Enzymes et Mécanismes Moléculaires (MEM2) de l'Institut de Chimie et de Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS-UMR 5246 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1), sous la direction du Professeur David MAGNE et la codirection du Docteur Laurence BESSUEILLE et du Professeur Kazem ZIBARA.

Résumé

Bien que la connaissance du score calcique (CAC) améliore la prédiction des événements cardiovasculaires, la situation reste assez controversée concernant l'impact local de la calcification sur la stabilité de la plaque athéroscléreuse. Le paradigme actuel suggère que les plaques très calcifiées sont plutôt stabilisées, alors que celles contenant des microcalcifications sont probablement dangereuses : en exacerbant l'inflammation des plaques, elles pourraient déclencher leur rupture.

Cependant, aucune approche expérimentale n'a permis de prévenir la formation des microcalcifications dans un modèle préclinique afin de déterminer leur réel impact. La phosphatase alcaline non spécifique du tissu (TNAP), qui est la seule enzyme absolument nécessaire à la minéralisation squelettique et dentaire, est fortement suspectée de participer à la calcification des plaques. La TNAP est exprimée dans les plaques athéroscléreuses, et est également produite par le foie et libérée dans la circulation sanguine à niveaux corrélés avec le syndrome métabolique et la mortalité cardiovasculaire. Dans ce contexte nous avons cherché dans un premier temps à explorer l'implication de la TNAP dans les plaques athéroscléreuses dans le modèle murin des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE). Dans un deuxième temps, nous avons cherché à étudier l'effet d'un inhibiteur de la TNAP récemment développé sous le nom de « SBI-425 » sur la calcification et le développement des plaques athéroscléreuses.

La calcification des plaques athéroscléreuses a été explorée chez des souris ApoE^{-/-} nourries avec un régime riche en gras à partir de 10 semaines d'âge et sacrifiées toutes les deux semaines, de 17 à 31 semaines dans une cohorte d'étude *in-vivo* (μ TEP/ μ CT) et *ex-vivo* [agent fluorescent osteosense (OS)]. L'expression et l'activité de la TNAP ont été explorées dans ce modèle murin ainsi que dans des plaques de carotides humaines calcifiées et non calcifiées. La TNAP a été inhibée par une administration orale de SBI-425 à une dose de 30 mg/kg/jour chez des souris ApoE^{-/-}, à partir de 10 semaines jusqu'à 25 semaines. En parallèle, elle a été inhibée *in-vitro* dans les cellules musculaires lisses vasculaires humaines (CML) avec l'inhibiteur MLS-0038949.

Dans les aortes de souris ApoE^{-/-}, ainsi que dans les carotides humaines, les calcifications des plaques sont systématiquement colocalisées avec l'activité locale de la TNAP. *In-vitro*, dans les CML humaines, l'inhibition de la TNAP a empêché la calcification. Chez les souris ApoE^{-/-}, l'inhibition de la TNAP par le SBI-425 a ralenti la calcification, a réduit l'inflammation et limité le développement de la plaque (réduit l'accumulation des lipides), en association avec une réduction du taux de cholestérol et de triglycérides dans le sang. Il est important de noter que ces effets bénéfiques de l'inhibition de la TNAP se sont produits sans produire d'impact significatif sur la prise de poids, la mortalité, l'architecture osseuse, et les reins. D'autre part, l'analyse métabolomique par RMN d'extraits de foie, a identifié la phosphocholine comme un substrat probable de la TNAP hépatique, dont la déphosphorylation réduite lors de l'inhibition de la TNAP peut avoir participé à la libération réduite de cholestérol et de triglycérides dans le sang, et à l'altération ultérieure du développement de la plaque.

En conclusion, nos résultats démontrent que l'inhibition systémique de la TNAP améliore l'athérosclérose, agissant à la fois sur la TNAP vasculaire et la TNAP hépatique.

Abstract

Although Knowledge of the calcium score (CAC), improves the prediction of cardiovascular events, the situation remains quite controversial regarding the local impact of calcification on the stability of atherosclerotic plaque. The current paradigm suggests that highly calcified plaques are rather stabilized, whereas those containing microcalcifications are probably dangerous: by exacerbating the inflammation of the plaques, they could trigger their rupture.

However, no experimental approach has been able to prevent the formation of microcalcifications in a preclinical model in order to determine their real impact. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), which is the only enzyme necessary for skeletal and dental mineralization, is strongly suspected to participate in plaque calcification. TNAP is expressed in atherosclerotic plaques, and is also produced in the liver and released in the circulation at levels that correlate with metabolic syndrome and cardiovascular mortality. In this context, we first sought to explore the involvement of TNAP in atherosclerotic plaques in the mouse model of mice deficient in apolipoprotein E (ApoE). Second, we set out to study the effect of a recently developed TNAP inhibitor «SBI-425» on atherosclerotic plaque calcification and development.

Plaque calcification was explored in 64 ApoE^{-/-} mice fed a high fat diet from 10 weeks of age, and sacrificed every two weeks, from 17 to 31 weeks with ¹⁸F-NaF positron emission tomography and computed tomography *in vivo*, and with the calcium tracer osteosense *ex vivo* (osteosense fluorescent agent (OS)). TNAP expression and/or activity were investigated in mice and in calcified and non-calcified human carotid plaques. TNAP was inhibited *in-vivo* in 52 mice by oral administration of SBI-425 (30 mg/kg/day), from 10 to 25 weeks of age. In parallel, it was inhibited *in-vitro* in human vascular smooth muscle cells (VSMCs) with its parental compound MLS-0038949.

In the aortas of ApoE-deficient mice, as well as in human carotids, plaque calcifications consistently colocalizes with local TNAP activity. *In-vitro*, in human VSMCs, TNAP inhibition prevented calcification. In ApoE^{-/-} mice, TNAP inhibition by SBI-425, prevented plaque calcification, reduced plaque inflammation and limited plaque development (reduced lipid accumulation), in association with reduced levels of serum cholesterol and triglycerides. Importantly, these beneficial effects of TNAP inhibition occurred without significant impact on weight, mortality, bone architecture and kidneys. On the other hand, metabolomics analysis by RMN of liver extracts identified phosphocholine as a likely substrate of liver TNAP, whose reduced dephosphorylation upon TNAP inhibition may have participated in the reduced release of cholesterol and triglycerides into the blood, and impaired plaque development.

In conclusion, our findings demonstrate that the systemic inhibition of TNAP for up to 25 weeks ameliorates atherosclerosis acting on both vascular and liver TNAP.

À mes chers parents, mes frères et ma sœur !

« Le génie est une longue patience »

Buffon

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Sarah BECK-CORMIER et les professeurs Saïd KAMEL et Marie-Hélène LAFAGE-PROUST d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'évaluer mon travail, ainsi que pour le temps que vous allez y consacrer. Je remercie également le Docteur Hervé KEMPF et le professeur Emmanuelle CANET-SOULAS d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse en tant qu'examineurs. Merci encore aux Docteurs Irma MACHUCA-GAYET et Luc MALAVAL de leurs conseils et leurs temps pendant mes comités de suivi de thèse.

Une thèse ne s'élabore pas en solitaire mais elle repose sur un encadrement de qualité, ce dont j'ai eu la chance de bénéficier d'une combinaison magnifique entre mon directeur de thèse et ma co-directrice. C'est pourquoi j'adresse mes premiers remerciements à mon directeur de thèse, le Professeur David MAGNE, Directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis reconnaissante pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, Chaque réunion était pour moi un encouragement renouvelé, j'en suis toujours sorti orientée et motivée. Je lui suis également reconnaissante pour la confiance qu'il m'a donnée, ses qualités pédagogiques et scientifiques, son enthousiasme et sa sympathie. Il a toujours des réponses à tout, j'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela. Un Chef exceptionnel comme vous je ne l'oublierais jamais !

Également, j'adresse de chaleureux remerciements à ma co-directrice de thèse, le Docteur Laurence BESSUEILLE, Maître de conférences, pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Son énergie et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir de travailler avec elle et je n'aurais pas imaginé la thèse sans elle. Un grand merci pour son aide humaine qu'elle m'a fournie dès mon arrivée en France et sa rassurance lorsque j'avais besoin. Pour moi tu étais beaucoup plus qu'une co-directrice, tu es une personne extraordinaire impossible de l'oublier !

J'exprime mes remerciements et ma reconnaissance à mon co-directeur de thèse, le Professeur Kazem ZIBARA, de m'avoir donnée l'opportunité de réaliser mon stage de Master 2 ainsi que ma thèse sous son co-direction. Il m'a toujours encouragée à aller plus haut et plus loin dans mes projets et ambitions. Sa remarquable carrière, la richesse de ses connaissances représentent des modèles à suivre dans ma future carrière. Je lui remercie pour tout le temps

qu'il a passé avec moi ainsi que pour tous ses conseils. Tout simplement, un grand merci pour tout ce que tu m'as apportée professionnellement et personnellement !

J'associe à ces remerciements le Docteur Eva HAMADE, sa gentillesse m'a toujours épatée, son encouragement et son soutien, ont été un équilibre parfait pour supporter les moments difficiles. Un grand merci pour son temps, son écoute et sa disponibilité dès que j'en avais besoin.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à l'ingénieur d'étude du laboratoire, Docteur Anne BRIOLAY grâce à qui j'ai appris le principe de la responsabilité envers un chercheur au laboratoire. Un énorme merci pour son implication direct et indirect dans mon projet de thèse. Anne m'a toujours supportée dans les bons moments comme dans les plus difficiles. Tu es comme une baguette magique, tu es et resteras ma « très chère ». À chaque fois que je vais manger la tarte aux poireaux, faire du sport, ou bien arroser mes plantes (en particulier mon petit cactus ;) je vais penser à toi, c'est-à-dire je ne t'oublierais jamais !

Je tiens à remercier les membres de l'équipe les Docteurs Carole BOUGAULT, Leyre BRIZUELA MADRID, Saïda MEBAREK et le Professeur René BUCHET pour leurs bonnes humeurs et leurs gentillesse.

Je dis merci au Professeur Abdelkarim ABOUSALHAM pour nos discussions pendant ma pause-café.

Je témoigne toute ma reconnaissance à nos nombreux collaborateurs pour ce projet : Dr Quillard T, Dr Goettsch C, Dr Taraconat N, Dr Balayssac S, Dr Gilard V, Dr Peyruchaud O, Dr Duboeuf F, Bouillot C, Dr Pinkerton A, Dr Mechtouff L, Dr Canet-Soulas E et Dr Millan JL.

Je remercie tout le personnel de l'animalerie pour s'être occupé de nos petites souris.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu l'opportunité de travailler au sein de l'équipe MES à l'université Américaine à Beyrouth (AUB) avant de débiter ma thèse. Je remercie énormément le Professeur Marwan El-SABBAN pour l'accueil dans son laboratoire, sa confiance, son esprit ouvert et ses pensées à voix haute étaient ma source d'inspiration ainsi que l'excellente ambiance de travail était ma source de motivation.

Pythagore : « Les amis sont des compagnons de voyage, qui nous aident à avancer sur le chemin d'une vie plus heureuse »

Le bon déroulement d'une thèse ne se joue pas uniquement sur les heures passées au labo mais également grâce aux moments agréables passés avec les proches, les amis, et le soutien de l'entourage. Alaeddine et Mathieu, c'est vrai que vous m'avez laissée toute seule dans le labo pendant ma troisième année, mais je suis tellement heureuse que vous soyez restés dans ma vie les amis avec qui je peux partager mes soucis et les oublier par nos soirées pique-nique et ciné.

J'adresse également mes remerciements à mes cousins, Hadi WEHBY et Ali ASSI qui ont été un vrai support tout au long de ces années. Un grand merci pour tous les moments heureux passés et à venir.

J'associe à ces remerciements tous mes ami(e)s Libanais, Tunisiens, Marocains, Turcs... Sans vous rien n'aurait été facile.

Enfin, mes plus profonds remerciements vont à ma famille à qui je dédie cette thèse. Par contre, aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte. Je mets entre vos mains, le fruit de longues années d'études, de longs mois de distance de votre amour de votre tendresse, de longs jours d'apprentissage. Loin de vous, votre soutien et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour préserver et pour prospérer dans la vie. Chaque ligne de cette thèse chaque mot et chaque lettre exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être ma famille. Pour mon père, Mahmoud KAWTHARANY, tu as été d'un énorme soutien moral et financière, et sans toi je ne serai jamais arrivée jusque-là. Tu m'as toujours montré à quel point tu es fier de moi, et sans lesquels je ne serai jamais arrivée. Tu es une vraie école de la vie. Pour toi ma mère, Fatima HODROJ, tu as toujours été là pour moi avec tes prières, c'est à cause de toi que je ne manque de rien aujourd'hui. Tu es le parfait exemple de sacrifices. Merci de m'avoir appris que l'amour est la plus grande force qui existe au monde. Maman, merci de m'avoir donné mes frères et ma sœur. Pour vous mes chers frères Abed Al Raouf et ALI et ma chère sœur Assil, mes mots ne seraient jamais à la hauteur de l'amour et l'affection que vous m'avez témoignée tout au long de ma vie. Vous m'avez permis de réaliser que la famille est sacrée. Un merci particulier de m'avoir tolérée au moment de la rédaction ☺. Vous savez déjà tous, alors je vous dis simplement « je suis chanceuse d'avoir une telle famille, je vous aime de tout mon cœur ».

A tous ceux qui liront ces pages et à tous qui ne les verront jamais, à ceux que j'ai cités et à ceux que j'ai pu oublier, merci d'avoir été là... !

Table des matières

RESUME	IV
ABSTRACT	V
REMERCIEMENTS	VII
TABLE DES MATIERES	2
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	14
CHAPITRE 1. ATHEROSCLEROSE	15
I. INTRODUCTION GENERALE	15
1. GENERALITES	15
2. EPIDEMIOLOGIE	15
3. PATHOLOGIES ET SIGNES CLINIQUES	17
4. PREVENTION ET DIAGNOSTIC	18
5. MODALITES D'IMAGERIE.....	18
5.1. Généralités	18
5.2. Tomographie par émission de positons	19
II. PHYSIOPATHOLOGIE VASCULAIRE : ATHEROSCLEROSE	20
1. PHYSIOLOGIE VASCULAIRE : STRUCTURE ET FONCTION	20
2. PATHOLOGIE VASCULAIRE : CLASSIFICATIONS ATHEROSCLEREUSES CHEZ L'HOMME	21
2.1. Classification de Stary et al (1992 ; 1994 ; 1995 ; 2000)	21
2.2. Classification de Virmani et al (2000).....	23
3. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA FORMATION DE LA PLAQUE ATHEROSCLEREUSE CHEZ L'HOMME	27
3.1. Dérégulation du profil lipidique	27
3.2. Initiation de la plaque athéroscléreuse par les LDL	28
3.3. L'Inflammation, de l'initiation à la progression de la plaque athéroscléreuse.....	31
3.4. CML : Progression de la plaque athéroscléreuse	43
CHAPITRE 2. CALCIFICATIONS VASCULAIRES	50
I. PHYSIOPATHOLOGIE VASCULAIRE : CALCIFICATIONS	50
1. SCORE CALCIQUE ET MORTALITE	50
2. HETEROGENEITE DES CALCIFICATIONS DANS LA PLAQUE ATHEROSCLEREUSE	51

2.1. Hétérogénéité selon la localisation de la plaque dans les artères.....	52
2.2. Progression selon le type de la plaque dans les artères	52
2.3. Morphologie dans les plaques humaines des artères coronaires	53
2.4. Morphologie dans les plaques humaines des artères périphériques	55
3. IMPACT DE LA LOCALISATION INTRAPLAQUE SUR LA VULNERABILITE	56
4. IMPACT DE LA TAILLE SUR L'ATHEROSCLEROSE : MACROCALCIFICATIONS	56
4.1. Définition	56
4.2. Classification.....	57
4.3. Détection	58
4.4. Inflammation et stabilisation	58
5. IMPACT DE LA TAILLE SUR L'ATHEROSCLEROSE : MICROCALCIFICATIONS	59
5.1. Définition	59
5.2. Classification.....	60
5.3. Détection	62
5.4. Inflammation et vulnérabilité	62
6. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA CALCIFICATION DES PLAQUES ATHEROSCLEREUSES.....	64
6.1. Calcification et apoptose	64
6.2. Calcifications et vésicules extracellulaires	66
6.3. Calcification des plaques par ossification endochondrale chez la souris	67
6.4. Des calcifications plutôt par formation osseuse chez l'homme ?.....	67
7. PERSPECTIVE CLINIQUE.....	68
CHAPITRE 3. PHOSPHATASE ALCAINE NON SPECIFIQUE DU TISSU	69
I. PHOSPHATASE ALCAINE NON SPECIFIQUE DU TISSU « TNAP »	69
1. GENERALITES	69
2. FONCTION PHYSIOLOGIQUE PRINCIPALE : LA MINERALISATION	70
3. POSSIBLES FONCTIONS INFLAMMATOIRES DE LA TNAP	73
3.1. La TNAP sanguine : une fonction dans l'inflammation ?.....	74
3.2. La TNAP, une nucléotidase ?.....	74
3.3. TNAP et LPS	75
4. IMPLICATIONS HEPATIQUES	76
5. IMPLICATIONS VASCULAIRES	76
5.1. Perturbation du niveau physiologique des inhibiteurs de calcifications	76
5.2. TNAP et calcifications vasculaires	77
CHAPITRE 4. MODELES MURINS D'ATHEROSCLEROSE.....	79
I. PRINCIPAUX MODELES.....	79
1. MODELE D'ETUDE : SOURIS APOE ^{-/-}	79
CHAPITRE 5 : OBJECTIFS DE LA THESE.....	81

MATERIEL ET METHODES83

1. APPROCHES EXPERIMENTALES.....	84
1.1. Caractérisation in-vivo et ex-vivo des calcifications athéroscléreuses.....	84
1.2. Caractérisation in-vivo et ex-vivo de l'implication de la TNAP dans les calcifications athéroscléreuses	85
2. DISSECTION DES TISSUS	85
3. COUPES DE L'ARCHE AORTIQUE.....	86
4. COLORATIONS HISTOLOGIQUES	87
4.1. Coloration BCIP/NBT : détection de l'activité phosphatase alcaline	87
4.2. Coloration Osteosense (OS) : détection des calcifications	87
4.3. Coloration Oil Red O : détection des lipides neutres	88
4.4. Coloration bleu alcian : détection des glycosaminoglycanes (GAG).....	88
5. IMMUNOHISTOCHEMIE : CD68	89
6. ANALYSE ET TRAITEMENT DES IMAGES	89
7. ANALYSE DE L'EXPRESSION GENIQUE	92
7.1. Extraction des ARN	92
7.2. Transcription inverse.....	93
7.3. PCR quantitative en temps réel (qPCR).....	93
7.4. Calcul de l'expression génique relative	93
8. ANALYSES BIOCHIMIQUES	94
8.1. Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline	94
8.2. Dosage du glucose.....	95
9. ANALYSES LIPIDIQUES	95
9.1. Mesure de la concentration en cholestérol total.....	95
9.2. Mesure de la concentration en triglycérides	96
10. ANALYSE DES MOLECULES SECRETEES PAR IMMUNOESSAI ENZYMATIQUE (ELISA)	97
10.1. Dosage d'IL-6	97
10.2. Dosage d'haptoglobine	98
11. CULTURE CELLULAIRE ET TRAITEMENT.....	99
11.1. Lignée cellulaire CML murine	99
11.2. Traitements	99
12. ANALYSES STATISTIQUES.....	100

RESULTATS 101

PARTIE A : IMPLICATION DE LA TNAP DANS LA CALCIFICATION DES PLAQUES ATHEROSCLEREUSES..... 102

I. DES PLAQUES PRECOCES LIPIDIQUES INFLAMMATOIRES AUX PLAQUES TARDIVES CALCIFIEES AVEC METAPLASIE CARTILAGINEUSE

1. Caractérisation du modèle murin ApoE ^{-/-}	102
1.1. Suivi du poids corporel.....	102

1.2. Détection des plaques.....	103
1.3. Détection des lipides intraplaques.....	103
2. Détection ex-vivo des calcifications chez les souris CT et ApoE ^{-/-}	104
3. Détection in-vivo des calcifications chez les souris CT et ApoE ^{-/-}	106
4. Détection ex-vivo de la TNAP chez les souris CT et ApoE ^{-/-}	108
5. Comparaison des localisations de la TNAP et des calcifications.....	108
6. Dosage de la TNAP sérique.....	110
7. Expression génique de la TNAP et de Runx2 dans les aortes abdominales.....	110
8. Progression des calcifications ex-vivo et métaplasie cartilagineuse.....	112
9. Progression des calcifications ex-vivo et plaques lipidiques.....	114
10. Calcifications et inflammation ex-vivo.....	115
11. Lien entre inflammation et différenciation ostéochondrocytaire.....	116
11.1. Corrélation entre IL-1 β , Sox9 et Runx2.....	116
11.2. Corrélation entre Il-6, Sox9 et Runx2.....	117
11.3. Corrélation entre Tnf- α , Sox9 et Runx2.....	118
II. TRAITEMENT DES SOURIS APOE ^{-/-} AVEC L'INHIBITEUR DE LA TNAP.....	119
1. MISE AU POINT DU MODELE D'ETUDE.....	119
1.1. Validation de l'inhibition de la TNAP par le SBI chez des souris C57BL/6.....	119
1.2. Suivi du poids corporel des souris ApoE ^{-/-}	120
1.3. Dosage de la TNAP sérique des souris ApoE ^{-/-}	121
1.4. Inhibition de la TNAP et architecture osseuse.....	122
2. Inhibition de la TNAP et détection des calcifications.....	123
2.1. Détection des calcifications in-vivo.....	123
2.2. Détection des calcifications ex-vivo.....	124
3. Expression génique de l'Opn dans les aortes abdominales en réponse à l'inhibition.....	125
4. Inhibition de la TNAP et inflammation locale.....	126
5. Inhibition de la TNAP et inflammation systémique.....	128
6. Inhibition de la TNAP et métaplasie cartilagineuse.....	129
7. Inhibition de la TNAP et développement des plaques.....	130
8. Inhibition de la TNAP et lipides circulants.....	131
9. Expression génique de l'Alpl dans le foie.....	132
10. Inflammation et fibrose dans le foie.....	132
PARTIE B : EFFET DES CRISTAUX SUR LA TRANSDIFFERENCIATION DES CML VERS DES CELLULES OSTEOCHONDROCYTAIRES.....	134
1. MISE AU POINT DU MODELE IN-VITRO.....	134
2. EXPRESSION GENIQUE DE L'OPN EN REPONSE AUX CRISTAUX.....	135
3. Effet des cristaux sur la trans-différenciation et l'inflammation des CML.....	135
3.1. Effet des cristaux sur l'induction de Bmp2.....	135
3.1. Effet indirect des cristaux sur Bmp2 via Il-6 et Tnf- α ?.....	136
4. Effet de Bmp2 sur la trans-différenciation ostéochondrocytaire.....	138
4.1. Expression génique de l'Acan en réponse aux cristaux.....	138
4.2. Expression génique de la Tnap en réponse aux cristaux.....	138

4.3. Expression génique de Sox9 et Runx2 en réponse aux cristaux	139
DISCUSSION	141
1. RAPPEL DU CONTEXTE	142
1.1. Calcifications athéroscléreuses	142
1.2. TNAP et calcifications athéroscléreuses	142
2. Synthèse des résultats tâche 1.....	143
2.1. Calcifications des plaques dans les souris ApoE ^{-/-}	143
2.2. Inflammation et calcification.....	143
2.3. Implication de la TNAP dans la calcification de plaque.....	145
2.4. La TNAP hépatique participe-t-elle aux calcifications athéroscléreuses ?	146
3. Synthèse des résultats tâche 2.....	147
3.1. Effets de l'inhibition de la TNAP par l'inhibiteur SBI-425.....	147
3.2. Effets du SBI-425 dans les souris ApoE ^{-/-}	147
3.3. Inhibition de la TNAP de 10 à 25 semaines	148
3.4. Inhibition de la TNAP de 10 à 31 semaines	149
CONCLUSION	152
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	154

Liste des figures

FIGURE 1 : MALADIES CARDIOVASCULAIRES , PRINCIPALE CAUSE DE MORTALITE DANS LE MONDE.....	16
FIGURE 2 : CONTRIBUTION DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES DANS LA MORTALITE MONDIALE DE 1990 A 2019	16
FIGURE 3 : MANIFESTATIONS CLINIQUES DE L'ATHEROSCLEROSE.....	17
FIGURE 4 : PHYSIOLOGIE VASCULAIRE	20
FIGURE 5 : CLASSIFICATION DES LESIONS ATHEROSCLEREUSES SELON L'AHA.....	21
FIGURE 6 : CLASSIFICATION DES LESIONS CORONARIENNES HUMAINES.....	23
FIGURE 7 : CARACTERISTIQUES DES LIPOPROTEINES	27
FIGURE 8 : SCHEMA DE LA TRANSCYTOSE DES LDL PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES	29
FIGURE 9 : LDL COMME PRINCIPAL MOTEUR DE L'ATHEROGENESE.....	30
FIGURE 10 : STRUCTURE DE « NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAP » (NET).....	34
FIGURE 11 : CYCLE DE VIE DES MACROPHAGES DANS LA PLAQUE ATHEROSCLEREUSE.....	35
FIGURE 12 : COUPES HISTOLOGIQUES REPRESENTATIVES DES ARTERES CORONAIRES HUMAINES.....	37
FIGURE 13 : ACTIVATION DE L'APOPTOSE ET DE LA NECROPTOSE MENANT A LA MORT CELLULAIRE.....	39
FIGURE 14 : MORT DES MACROPHAGES ET VULNERABILITE DE LA PLAQUE	41
FIGURE 15 : EQUILIBRE ENTRE LES PROCESSUS PRO-INFLAMMATOIRES ET ANTI-INFLAMMATOIRES	43
FIGURE 16 : VUE D'ENSEMBLE DE LA MODULATION PHENOTYPIQUE DES CML DANS LA PAROI ARTERIELLE	44
FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE PLUSIEURS PROCESSUS MEDIES PAR LES CML.....	46
FIGURE 18 : SENESCENCE DES CML DANS L'ATHEROSCLEROSE ET INSTABILITE DE LA PLAQUE	48
FIGURE 19 : DEGRE DE CALCIFICATION PAR TYPE DE PLAQUE.....	51
FIGURE 20 : LESIONS ATHEROSCLEREUSES HETEROGENES DANS DIFFERENTS ARTERES	52
FIGURE 21 : GRAPHIQUE MONTRANT LE POURCENTAGE DE RETRECISSEMENT DE LA ZONE DE LA LUMIERE DES PLAQUES.....	53
FIGURE 22 : COUPES HISTOLOGIQUES REPRESENTATIVES MONTRANT LA PROGRESSION DES CALCIFICATIONS DANS LES PLAQUES CORONAIRES HUMAINES.....	54
FIGURE 23 : COUPES HISTOLOGIQUES REPRESENTATIVES MONTRANT LA PROGRESSION DE LA CALCIFICATION INTIMALE DANS LES ARTERES PERIPHERIQUES DES MEMBRES INFERIEURS	55
FIGURE 24 : IMAGE REPRESENTATIVE DE MACROCALCIFICATIONS.....	56
FIGURE 25 : RADIOGRAPHIE ET IMAGES HISTOLOGIQUES EN COUPE TRANSVERSALE DES ARTERES CORONAIRES ..	57
FIGURE 26 : MECANISMES CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DU MODELE DE LA CALCIFICATION ATHEROSCLEREUSE.....	58
FIGURE 27 : IMAGE REPRESENTATIVE DE MICROCALCIFICATIONS.....	59
FIGURE 28 : DETECTION DES DIFFERENTES FORMES DE MICROCALCIFICATIONS CORONAIRES DANS LES PIT ET LES FIBROATHEROMES	60
FIGURE 29 : IMAGES EX-VIVO D'UNE CAROTIDE HUMAINE EXCISEE D'UN PATIENT PRESENTANT UN AVC.....	61
FIGURE 30 : MECANISMES CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA REGULATION DU MODELE DE LA CALCIFICATION ATHEROSCLEREUSE.....	63
FIGURE 31 : MECANISMES DE PROPAGATION DU NOYAU NECROTIQUE DANS LES PLAQUES CORONAIRES HUMAINES	65
FIGURE 32 : VESICULES EXTRACELLULAIRES, MOTEURS DE LA CALCIFICATION VASCULAIRE	66

FIGURE 33 : SCHEMA CONCEPTUEL DE LA CALCIFICATION DE L'ARTERE CORONAIRE PAR TYPE DE PLAQUE	68
FIGURE 34 : STRUCTURE ET SUBSTRATS DE LA TNAP	70
FIGURE 35 : FACTEURS DE TRANSCRIPTIONS ET MARQUEURS IMPLIQUES DANS LA TRANSDIFFERENCIATION OSTEOCHONDROCYTAIRE.....	71
FIGURE 36 : SCHEMA REPRESENTATIF DE LA MINERALISATION A MEDIATION DES VESICULES MATRICIELLES ET DE LA TNAP.....	73
FIGURE 37 : MECANISMES CELLULAIRE ET ROLE DE LA TNAP	75
FIGURE 38 : MECANISMES PUTATIFS DE L'ASSOCIATION ENTRE LA TNAP ET L'ATHEROSCLEROSE	78
FIGURE 39 : MECANISME POSSIBLE DE LA CALCIFICATION VASCULAIRE INDUITE PAR LA TNAP	82
FIGURE 40, A : APPROCHES EXPERIMENTALES IN-VIVO ET EX-VIVO (COHORTE 1 ET 2)	84
FIGURE 40, B: APPROCHES EXPERIMENTALES EX-VIVO ET IN-VIVO (COHORTE 3 ET 4)	85
FIGURE 41 : SCHEMA REPRESENTATIF DE LA DISSECTION DE L'ARCHE AORTIQUE	86
FIGURE 42 : SCHEMA REPRESENTATIF DES COUPES SERIEES DES ARCHES AORTIQUES PAR SOURIS SUR DES LAMES EN VERRE	86
FIGURE 43 : REACTION ENTRE LES REACTIFS BCIP/NBT ET LA PHOSPHATASE ALCALINE	87
FIGURE 44 : PHOTOS RECAPITULATIVES DES DIFFERENTES ETAPES REALISEES PAR LE LOGICIEL IMAGE J.	91
FIGURE 45 : SCHEMA RECAPITULATIF DE L'EXTRACTION DES ARN.....	92
FIGURE 46 : PRINCIPE DU DOSAGE DE GLUCOSE VIA DEUX REACTIONS ENZYMATIQUES COUPLEES	95
FIGURE 47 : PRINCIPE DU DOSAGE DU CHOLESTEROL VIA TROIS REACTIONS ENZYMATIQUES COUPLEES	96
FIGURE 48 : PRINCIPE DU DOSAGE DES TRIGLYCERIDES VIA DES REACTIONS ENZYMATIQUES COUPLEES	97
FIGURE 49 : SCHEMA RECAPITULATIF DU DOSAGE D'IL-6.....	98
FIGURE 50 : SCHEMA RECAPITULATIF DU DOSAGE D'HAPTOGLOBINE	98
FIGURE 51 : TRAITEMENT DES MOVAS PAR LES CRISTAUX D'HYDROXYAPATITE EN FONCTION DU TEMPS	99
FIGURE 52 : EVOLUTION DU POIDS CORPOREL DES SOURIS CT ET APOE ^{-/-}	101
FIGURE 53 : COUPES HISTOLOGIQUES MONTRANT L'ABSENCE OU LA PRESENCE DES PLAQUES DANS LES COUPES D'ARCHE AORTIQUE DES SOURIS CT ET DES SOURIS APOE ^{-/-}	103
FIGURE 54 : ANALYSE HISTOLOGIQUE DES LIPIDES DANS LES PLAQUES DES SOURIS CT ET DES SOURIS APOE ^{-/-} A 25 ET 31 SEMAINES.....	104
FIGURE 55 : COLORATION HISTOLOGIQUE DE LA CALCIFICATION DES SOURIS CT ET DES SOURIS APOE ^{-/-}	105
FIGURE 56 : QUANTIFICATION DU NOMBRE ET DE LA SURFACE MOYENNE DE CALCIFICATIONS DE 17 A 31 SEMAINES.	105
FIGURE 57 : IMAGERIE IN-VIVO DES CALCIFICATIONS AORTIQUES	107
FIGURE 58 : COLORATION HISTOLOGIQUE DE L'ACTIVITE TNAP DANS LES PLAQUES DES SOURIS CT ET DES SOURIS APOE ^{-/-} DE 17 A 29 SEMAINES.....	108
FIGURE 59 : COMPARAISON HISTOLOGIQUE DES CALCIFICATIONS ET DE L'ACTIVITE TNAP DES SOURIS APOE ^{-/-} A 17 ET 19 SEMAINES	109
FIGURE 60 : COMPARAISON HISTOLOGIQUE DES CALCIFICATIONS ET DE L'ACTIVITE TNAP DES SOURIS APO E ^{-/-} A 21 SEMAINES	109
FIGURE 61 : DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA TNAP SERIQUE DES SOURIS APOE ^{-/-} ENTRE 17 ET 31 SEMAINES	110
FIGURE 62 : EXPRESSION GENIQUE D'ALPL ET RUNX2 DANS L'AORTE ABDOMINALE DES SOURIS APOE ^{-/-}	113
FIGURE 63 : COMPARAISON DE LA LOCALISATION DES ZONES DE CALCIFICATION ET DES ZONES CARTILAGINEUSES DANS LES ARCHES AORTIQUES DES SOURIS APOE ^{-/-} DE 25 ET 31 SEMAINES.....	112
FIGURE 64 : EXPRESSION GENIQUE DE BMP-2 DANS L'AORTE ABDOMINALE DES SOURIS APOE ^{-/-}	113

FIGURE 65 : EXPRESSION GENIQUE DE SOX9 ET ACAN DANS L'AOORTE ABDOMINALE DES SOURIS APOE ^{-/-}	113
FIGURE 66 : ANALYSE HISTOLOGIQUE DES CALCIFICATIONS, DU CARTILAGE ET DES LIPIDES DES SOURIS APOE ^{-/-} DE 25 SEMAINES.	114
FIGURE 67 : EXPRESSION GENIQUE D'IL-1 β , IL-6 ET TNF- α DANS L'AOORTE ABDOMINALE DES SOURIS APOE ^{-/-}	115
FIGURE 68 : ANALYSE HISTOLOGIQUE DES CALCIFICATIONS PRECOCES ET TARDIVES, COMPARES AUX ZONES INFLAMMATOIRES DES SOURIS APOE ^{-/-} DE 31 SEMAINES.	116
FIGURE 69 : CORRELATIONS ENTRE LES NIVEAUX D'EXPRESSION D'IL-1B ET SOX9 OU RUNX2 ENTRE 17 ET 21 SEMAINES ET 27 ET 31 SEMAINES	117
FIGURE 70 : CORRELATIONS ENTRE LES NIVEAUX D'EXPRESSION D'IL-6 ET SOX9 OU RUNX2 ENTRE 17 ET 21 SEMAINES ET 27 ET 31 SEMAINES.	118
FIGURE 71 : CORRELATIONS ENTRE LES NIVEAUX D'EXPRESSION DE TNF-A, SOX9 ET RUNX2 ENTRE 17 ET 21 SEMAINES ET 27 ET 31 SEMAINES.	118
FIGURE 72 : DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA TNAP DANS LE PLASMA DES SOURIS C57BL/6 (CT) ET DES SOURIS SBI.	120
FIGURE 73 : EVOLUTION DU POIDS CORPOREL DES SOURIS CT ET SBI EN FONCTION DE L'AGE	120
FIGURE 74 : DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA TNAP DANS LE SERUM DES SOURIS CT ET DES SOURIS SBI A 25 ET 31 SEMAINES.	121
FIGURE 75 : PARAMETRES D'ARCHITECTURE OSSEUSE DES FEMURS ET TIBIAS DETERMINES A 31 SEMAINES CHEZ LES SOURIS CT ET SBI.	122
FIGURE 76 : QUANTIFICATION IN-VIVO DU VOLUME ET DE L'ACTIVITE DE CALCIFICATION MESUREE PAR μ CT/ μ TEP	123
FIGURE 77 : QUANTIFICATION HISTOLOGIQUE DU NOMBRE DE CALCIFICATIONS DES SOURIS CT ET SBI (EX-VIVO)	124
FIGURE 78 : QUANTIFICATION HISTOLOGIQUE DE LA SURFACE MOYENNE DES CALCIFICATIONS DES SOURIS CT ET SBI (EX-VIVO).	125
FIGURE 79 : EXPRESSION GENIQUE DE L'OPN DANS L'AOORTE ABDOMINALE DES SOURIS CT ET SBI	126
FIGURE 80 : EXPRESSION GENIQUE DE CD68, IL-8 ET IL-6 DANS L'AOORTE ABDOMINALE DES SOURIS CT ET SBI	127
FIGURE 81 : DOSAGE D'IL-6 ET D'HAPTOGLOBINE DANS LE SERUM DES SOURIS CT ET SBI	128
FIGURE 82 : EXPRESSION GENIQUE DE SOX9, ACAN ET RUNX2 DANS L'AOORTE ABDOMINALE DES SOURIS CT ET SBI.	129
FIGURE 83 : QUANTIFICATION HISTOLOGIQUE DE LA SURFACE TOTALE DES PLAQUES DES SOURIS CT ET SBI.	130
FIGURE 84 : DOSAGES DE TG ET DE CHOLESTEROL DANS LE SERUM DES SOURIS CT ET SBI.	131
FIGURE 85 : EXPRESSION GENIQUE D'ALPL DANS LE FOIE DES SOURIS APOE ^{-/-}	132
FIGURE 86 : EXPRESSION GENIQUE DE TNF-A, TGF- β ET COL1A2 DANS LE FOIE DES SOURIS APOE ^{-/-}	133
FIGURE 87 : OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES MOVAS APRES 8 H	134
FIGURE 88 : EXPRESSION GENIQUE DE L'OPN DANS LES MOVAS AU COURS DU TEMPS	135
FIGURE 89 : EXPRESSION GENIQUE DE BMP2 DANS LES MOVAS AU COURS DU TEMPS	136
FIGURE 90 : EXPRESSION GENIQUE D'IL-6 ET DE TNF-A DANS LES MOVAS AU COURS DU TEMPS.	137
FIGURE 91 : EXPRESSION GENIQUE DE L'ACAN DANS LES MOVAS AU COURS DU TEMPS.	138
FIGURE 92 : EXPRESSION GENIQUE DE LA TNAP DANS LES MOVAS AU COURS DU TEMPS	139
FIGURE 93 : EXPRESSION GENIQUE DE SOX9 ET DE RUNX2 DANS LES MOVAS AU COURS DU TEMPS.	140
FIGURE 94 : INFLAMMATION ET MICROCALCIFICATIONS DANS LE CONTEXTE ARTERIOSCLEREUX.	145

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : COUPLES D'AMORCES UTILISEES EN QPCR ET TEMPERATURE D'HYBRIDATION CORRESPONDANTE.. 94

Liste des abréviations

AB : Apoptotic bodies (Corps apoptotiques)

AIT : Épaississement adaptatif de l'intima

AMP : Adénosine monophosphate

ApoE : Apolipoprotéine E

ATP : Adénosine triphosphate

AVC : Accident vasculaire cérébral

BMP : Bone morphogenic protein (protéines morphogéniques osseux)

CAC : Calcium de l'artère coronaire

CML : Cellules musculaires lisses

CRP : C-reactive protein (Protéine C-réactive)

CT scan : Tomodensitométrie

CV : Calcifications vasculaires

DIT : Épaississement intimal diffus

ESC : Cholestérol estérifié

FRC : Cholestérol libre

HA : Hydroxyapatite

HDL : High-density lipoprotein (Lipoprotéines de haute densité)

IL : Interleukine

IRC : Insuffisance rénale chronique

IRM : Imagerie par résonance magnétique

LDL : Lipoprotéines de basse densité

LPS : Lipopolysaccharide

MCV : Maladies cardiovasculaires

MEC : Matrice extracellulaire

MGP : Matrix Gla-protein (Protéine Gla matricielle)

NC : Necrotic core (cœur nécrotique)

NET : Neutrophil extracellular traps (Piège extracellulaire des neutrophiles)

OCN : Ostéocalcine

OCT : Tomographie en cohérence optique

OPN : Ostéopontine

OS : Osteosense

PIT : Pathologic intimal thickening (Épaississement pathologique de l'intima)

PLP : Pyridoxal phosphate

PPi : Pyrophosphate inorganique

Runx2 : Runt-related transcription factor 2

Sox9 : SRY (sex determining region Y) -Box9

TCFA : Thin-cap Fibroatheroma (Fibroathérome à coiffe mince)

TEP : Tomographie par émission de positons

TGF- β : Transforming growth factor beta (Facteur de croissance transformant)

TNAP : Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (Phosphatase alcaline non spécifique du tissu)

TNF : Tumor Necrosis Factor alpha (Facteur de nécrose tumorale)

VE : Vésicules extracellulaires

VM : Vésicules matricielles



Introduction

Chapitre 1. Athérosclérose

I. Introduction générale

1. Généralités

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la première cause de mortalité dans le monde (<https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases>). Elles constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins qui comprend les cardiopathies coronariennes, les maladies cérébro-vasculaires, les artériopathies périphériques et d'autres affections. Les infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont généralement des événements aigus et sont causés principalement par une obstruction des vaisseaux qui empêche le sang de circuler vers le cœur ou le cerveau. La raison la plus courante est l'accumulation de dépôts graisseux sur les parois internes des vaisseaux sanguins qui alimentent le cœur ou le cerveau, également connu sous le nom d'athérosclérose.

Le groupe de l'OMS d'étude de la classification des lésions d'athérosclérose s'est réuni en 1957 afin d'établir une définition uniforme de l'athérosclérose. La définition donnée est la suivante : « association variable de remaniements de l'intima des artères de grand et moyen calibre, consistant en une accumulation segmentaire de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calciques, le tout accompagné de modifications de la média ».

La calcification vasculaire (CV) est considérée comme une complication de la plaque athéroscléreuse, et est reconnue actuellement comme un processus pathobiologique programmé, partageant des caractéristiques avec l'ossification. Etant donné que les calcifications vasculaires sont le centre de notre travail, le processus de ces dernières sera détaillé ensuite.

2. Epidémiologie

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) et l'étude du « *global burden of disease* » (GBD) (Fig.1), 17,9 millions de personnes décèdent chaque année de maladies cardiovasculaires, soit 31 % de tous les décès dans le monde (<https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases>). Parmi ces décès, environ 7,4 millions surviennent en raison d'une cardiopathie coronarienne et 6,7 millions en raison d'un AVC. Les maladies cardiovasculaires qui comprennent les cardiopathies ischémiques, les accidents vasculaires cérébraux et l'hypertension, constituent collectivement la première cause de décès dans le monde¹ (Fig.2). Plus des trois quarts des décès liés aux maladies cardiovasculaires interviennent dans les pays à revenus faible ou intermédiaire alors que l'athérosclérose est plus fréquente dans les pays développés.

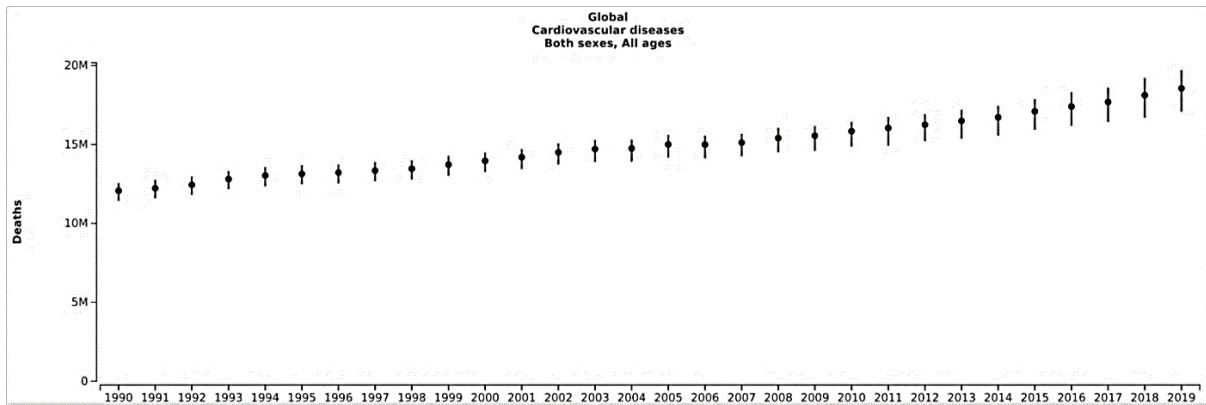


Figure 1 : Maladies cardiovasculaires (MCV), principale cause de mortalité dans le monde. Nombre de décès dus à des maladies cardiovasculaires dans le monde de 1990 à 2019. Données obtenues à partir de l'étude du GBD (<https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>).

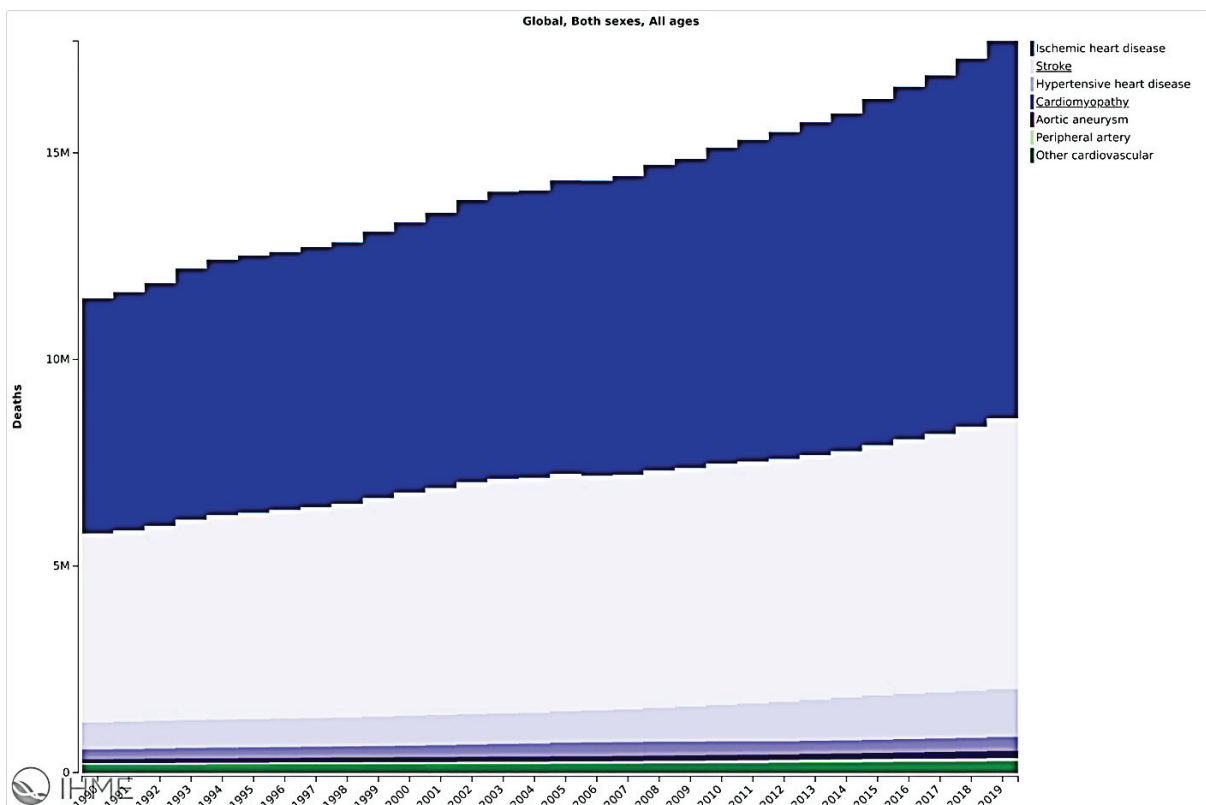


Figure 2 : Contribution des maladies cardiovasculaires dans la mortalité mondiale de 1990 à 2019. Ces données traduisent l'importance des maladies cardiovasculaires à l'échelle mondiale. Ces données classent l'ischémie et l'AVC, parmi les maladies cardiovasculaires, comme les deux premières principales causes de mortalité dans le monde. Données obtenues à partir l'étude du GBD (<https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>).

3. Pathologies et signes cliniques

L'athérosclérose est une maladie diffuse à progression lente, pouvant affecter plusieurs territoires artériels² (Fig.3). À cause de cette progression lente, la plupart des cas restent asymptomatiques plusieurs décennies. Lorsque les symptômes apparaissent, ils sont dus à une réduction du flux sanguin causée par la sténose luminale (rétrécissement) ou à une occlusion thrombotique. Une ischémie due à des lésions sténotiques limitant le débit sanguin peut se produire dans des conditions de demande myocardique accrue en oxygène (par exemple lors d'un effort physique) et provoquer des symptômes d'angine de poitrine (douleur thoracique ou inconfort causé par une perfusion insuffisante du muscle cardiaque). L'occlusion thrombotique aiguë qui interrompt l'apport d'oxygène myocardique résulte généralement de la perturbation des plaques athéroscléreuses³. La présentation clinique de l'athérosclérose peut être aiguë ou chronique et varie considérablement selon le territoire vasculaire impliqué (Fig.3).

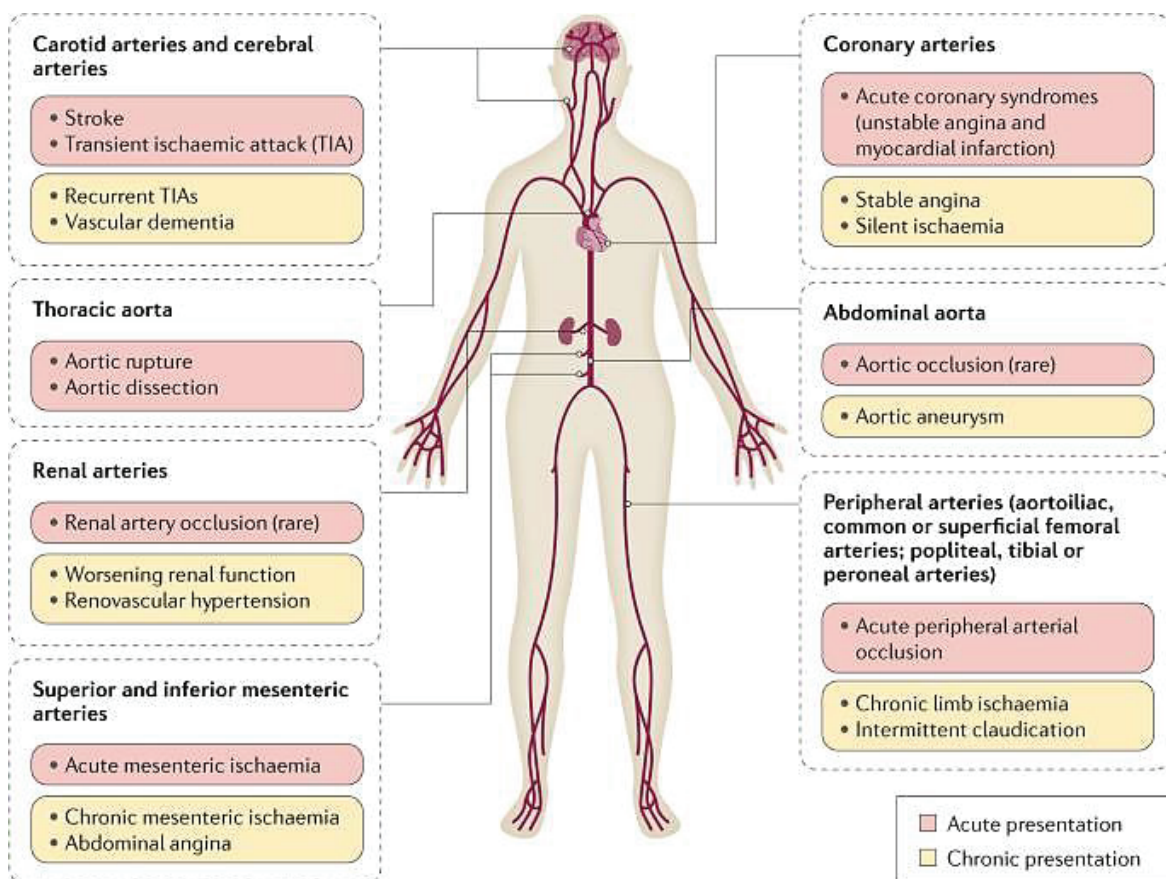


Figure 3 : Manifestations cliniques de l'athérosclérose. L'athérosclérose est une maladie systémique qui peut impliquer plusieurs vaisseaux. Par conséquent, les manifestations cliniques varient largement selon le territoire vasculaire impliqué. (Adapté de ⁵).

Dans certaines artères, comme les artères rénales, la présentation clinique la plus courante est un syndrome chronique à développement long (par exemple, une hypertension rénovasculaire progressive ou une aggravation de la fonction rénale due à une sténose de l'artère rénale). Dans les artères coronaires, les symptômes d'angine de poitrine sont les plus fréquents. En d'autres territoires vasculaires l'athérosclérose se manifeste le plus souvent par des signes cliniques aigus et soudains, tels que l'AVC et l'ischémie aigüe due à l'athérosclérose.

4. Prévention et diagnostic

Idéalement la prévention primaire commence par l'adoption d'un mode de vie sain dès l'enfance (prévention primordiale), mais une modification des facteurs de risque pour prévenir, voire inverser, la progression du processus athérosclérotique peut apporter des bienfaits à tout stade de la maladie, même dans le cadre de la prévention secondaire⁴.

Le diagnostic définitif de l'athérosclérose, après examen des signes cliniques, dépend généralement de tests d'imagerie pour une visualisation directe des lésions⁵. Chaque méthode d'imagerie aborde un scénario clinique spécifique, certaines sont utilisées pour simplement détecter et identifier l'athérosclérose dans divers territoires vasculaires, alors que d'autres servent principalement à orienter les thérapies interventionnelles. Par exemple, la mesure du score calcique (CAC) par tomодensitométrie (ou CT scan) chez les patients asymptomatiques peut identifier l'athérosclérose non-invasive. Cependant, les données actuelles ne prennent pas en charge leur utilisation comme la seule méthode de dépistage de l'athérosclérose dans le but de la prévention primaire. Les autres technologies d'imagerie (par exemple, la tomographie par émission de positons TEP) ont tendance à être utilisées dans la recherche sur l'évaluation de l'athérosclérose.

5. Modalités d'imagerie

5.1. Généralités

Dans la pratique clinique les modalités d'imagerie anatomique telles que la tomодensitométrie, l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont essentielles pour visualiser l'anatomie vasculaire et diagnostiquer la gravité de la sténose athéroscléreuse, mais ne fournissent pas systématiquement d'informations sur le processus physiopathologique sous-jacent, la maladie et ses conséquences. Les progrès de la recherche sur l'imagerie moléculaire de l'athérosclérose offrent des opportunités d'exploration des mécanismes pathologiques qui se produisent au niveau cellulaire et à l'intérieur de la paroi du vaisseau. Lorsqu'elle est appliquée à l'étude de l'athérosclérose, l'imagerie nucléaire avec tomographie par émission de positons présente le potentiel de détecter des changements vasculaires précoces, avant l'apparition de symptômes cliniques ou même avant une sténose luminale détectable par angiographie. La technique d'imagerie multimodale utilisant une association TEP/CT présente également l'avantage de combiner des ensembles de données

anatomiques, fonctionnelles et moléculaires. Et enfin l'imagerie moléculaire « *near-infrared-fluorescence-imaging* » (NIRF) a permis d'obtenir des informations sur la progression de l'athérosclérose à haute résolution.

5.2. Tomographie par émission de positons

La TEP produit des images quantitatives tridimensionnelles de la distribution d'un radionucléide émetteur de positons applicables aux domaines tels que l'oncologie, la neurologie et la cardiologie. La TEP est basée sur la désintégration radioactive du ^{18}F -fluorure de sodium ($^{18}\text{F}\text{-Na}$). Le traceur $^{18}\text{F}\text{-Na}$ se dépose généralement dans l'os où le fluor subit un échange rapide avec le groupe hydroxyle (-OH) à la surface de la matrice d'hydroxyapatite (HA) pour former la fluoroapatite⁶. Sa principale application clinique a été dans l'évaluation de pathologies osseuses et des tumeurs métastatiques⁷. Un intérêt plus récent s'est concentré sur son rôle dans l'identification des microcalcifications dans le système cardiovasculaire et en particulier dans l'athérosclérose. Derlin et al ont démontré le potentiel de cette technique pour la détection des microcalcifications à un stade précoce ou « actif » de l'athérogenèse en utilisant le $^{18}\text{F}\text{-Na}$ dans les plaques carotidiennes humaines⁸. Dweck et al ont démontré un signal important correspondant à la fixation du $^{18}\text{F}\text{-Na}$ dans des plaques d'artères coronaires humaines⁹. Le $^{18}\text{F}\text{-Na}$, en se fixant dans les zones de calcification en cours de formation, pourrait constituer un nouveau biomarqueur non-invasif de la pathologie.

II. Physiopathologie vasculaire : athérosclérose

1. Physiologie vasculaire : structure et fonction

La paroi vasculaire est composée de plusieurs couches cellulaires (Fig. 4), comprenant des cellules endothéliales (CE), des cellules musculaires lisses vasculaires (CML), des fibroblastes et des composants de la matrice extracellulaire (MEC), tels que l'élastine et le collagène¹⁰.

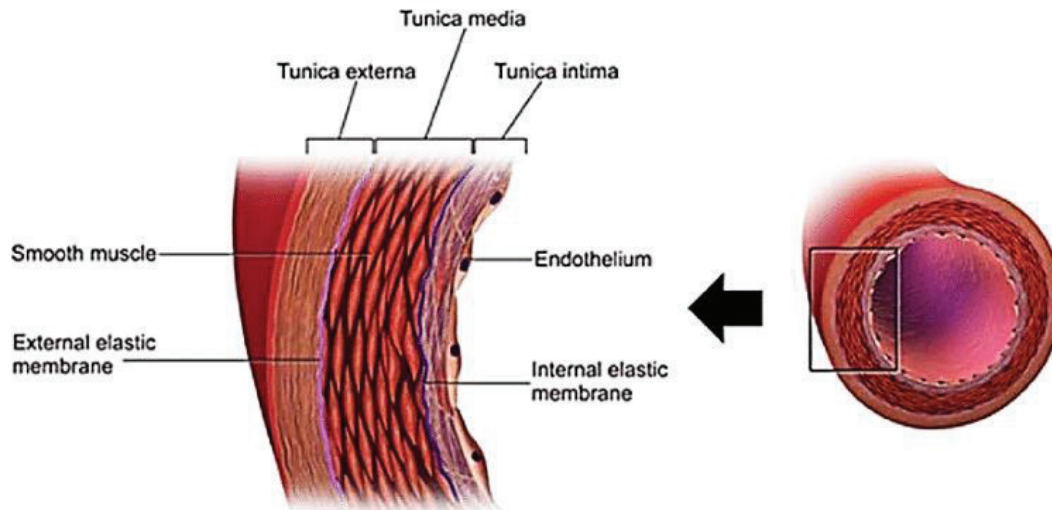


Figure 4 : Physiologie vasculaire. (Tiré de wikipédia).

L'intima est la couche interne du vaisseau formée par une couche de CE qui repose sur la membrane basale via des molécules d'adhésion et séparée de la média par la lame élastique interne¹¹. L'endothélium, qui recouvre l'intima du côté de la lumière du vaisseau, est une barrière semi-perméable avec des jonctions intercellulaires (jonctions serrées) qui régule le passage des molécules à travers la paroi vasculaire^{12,13}. Elle participe à la fois aux réponses immunitaires et inflammatoires, à l'hémostase et à la régulation de la perméabilité¹². La membrane basale, qui fait partie de la MEC, est principalement composée de différents types de collagènes, de laminines, de protéoglycanes, de fibronectines et de facteur Von Willebrand¹¹.

La média est la couche intermédiaire du vaisseau, composée de CML, qui présente une plasticité biologique importante, et de la MEC. En conditions physiologiques normales les CML présentent un phénotype contractile (différencié)¹⁴. La média montre la variabilité la plus importante de la structure de la MEC en fonction du type de vaisseaux sanguins^{15,11}. Elle est principalement composée d'élastines, qui en plus d'avoir une fonction structurale, sont impliquées dans la régulation de la prolifération des CML. Les autres composants de la MEC sont les fibres de collagènes principalement de type I et III¹¹.

L'adventice est la couche externe du vaisseau, séparée de la couche médiale par une lame élastique externe. C'est une couche complexe, formée par le tissu conjonctif fibroblastique, qui est activement impliquée dans les réponses immunitaires et inflammatoires, le développement et le remodelage vasculaires. Outre la MEC, elle contient le vasa vasorum (ensemble de petits vaisseaux nourriciers issus de petites artères et veines)¹⁶, le tissu adipeux périvasculaire, les terminaisons nerveuses, les vaisseaux lymphatiques, les différents types de cellules telles que les fibroblastes, les macrophages, les cellules dendritiques et les plasmocytes. Ces différentes cellules effectuent une surveillance importante et les fonctions immunitaires innées en réponse à des antigènes étrangers^{17,18}, conférant à cette couche un rôle clé dans la régulation de la fonction de la paroi vasculaire^{15,19}.

2. Pathologie vasculaire : classifications athéroscléroseuses chez l'homme

2.1. Classification de Stary et al (1992 ; 1994 ; 1995 ; 2000)

La pathogenèse des lésions athéroscléroseuses a été déduite de l'analyse microscopique des artères humaines dans différents groupes d'âge. Ce domaine de recherche a été largement examiné par Stary et al dans une série d'articles qui reste l'une des ressources les plus riches pour les descriptions microscopiques de l'athérosclérose^{20,21,22}. Ces travaux ont également conduit à une proposition de classification histologique des lésions athéroscléroseuses (classifications de H.C. Stary et de l'*American Heart Association* (AHA), types I-VIII)²³ (Fig. 5).

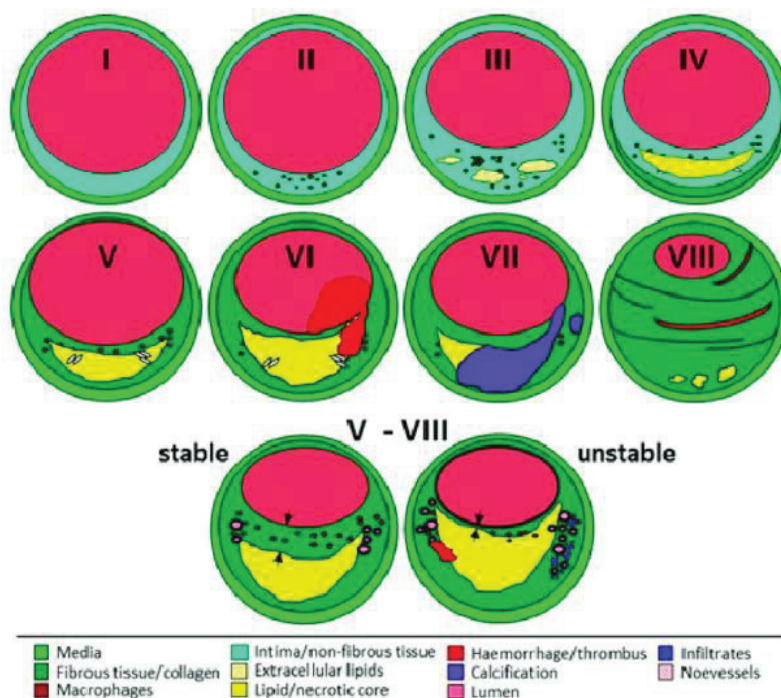


Figure 5 : Classification des lésions athéroscléroseuses selon l'AHA. (Adapté de ^{21,20,22,23}).

La lésion initiale de **type I** représente les tout premiers changements, dont suffisamment de lipoprotéines athérogènes pour provoquer une augmentation en nombre des macrophages. Ces changements sont plus marqués dans les types de lésions suivantes.

La lésion de **type II**, comprend les stries graisseuses, premières lésions grossièrement visibles et caractérisées par des couches de macrophages spumeux et de gouttelettes lipidiques dans les CML intimaux^{24,25}.

La lésion de **type III** apparaît dans certains épaissements intimaux adaptatifs chez les jeunes adultes, est caractérisée par de petites gouttelettes hétérogènes de lipides extracellulaires, en plus de tous les autres composants de la lésion de type II.

La lésion de **type IV** montre une accumulation dense de lipides extracellulaires, occupant une région de l'intima étendue mais bien définie. Cette lésion n'est pas caractérisée par une augmentation du tissu fibreux, ni par des complications telle que la présence d'une thrombose. Ce type d'accumulation de lipides extracellulaires est connu sous le nom de noyau lipidique. La lésion de type IV est également connue sous le nom d'athérome, c'est la première lésion considérée comme avancée dans cette classification en raison de la désorganisation intimaux sévère provoquée par le noyau lipidique.

La lésion de **type V**, qui a généralement un noyau lipidique, peut également contenir des couches épaisses de tissu conjonctif fibreux, ce type de morphologie pouvant être appelé fibroathérome. Certaines lésions de type V sont largement calcifiées (**type Vb**) et certaines sont principalement constituées de tissu conjonctif fibreux avec peu ou pas d'accumulation de lipides ou de calcium (**type Vc**). Les morphologies de lésions qui ont été répertoriées comme types Vb et Vc selon la classification recommandée par l'AHA en 1995, sont mises à jour en tant que lésions de types VII et VIII respectivement²².

La lésion de **type VI** qui a toujours un noyau lipidique, peut également contenir une fissure, un hématome et un thrombus.

Les études de H.C. Stary en 1999 ont indiqué que chez le primate la régression à partir de lésions comparables aux types humains IV et V (le type VI n'était pas produit) conduit à des morphologies telles que celles désignées sur la figure 5 comme **types VII** et **VIII**²⁶. Les lésions contenant une grande quantité de calcium ont généralement une augmentation du tissu conjonctif fibreux et il existe souvent la morphologie sous-jacente du fibroathérome. Les dépôts minéraux peuvent remplacer les restes de cellules mortes et de lipides extracellulaires accumulés, y compris des noyaux lipidiques entiers. La lésion calcifiante a été qualifiée de lésion de **type VII**^{21,20,22}.

La lésion de **type VIII** est représentée par l'épaississement et le remplacement de l'intima normale par du tissu conjonctif fibreux, tandis que les lipides sont minimales, voire absents.

2.2. Classification de Virmani et al (2000)

Une classification alternative et plus simple, qui met l'accent sur le lien entre la morphologie des lésions et la maladie clinique, a été introduite plus tard par Virmani et al²⁷ (Fig. 6).

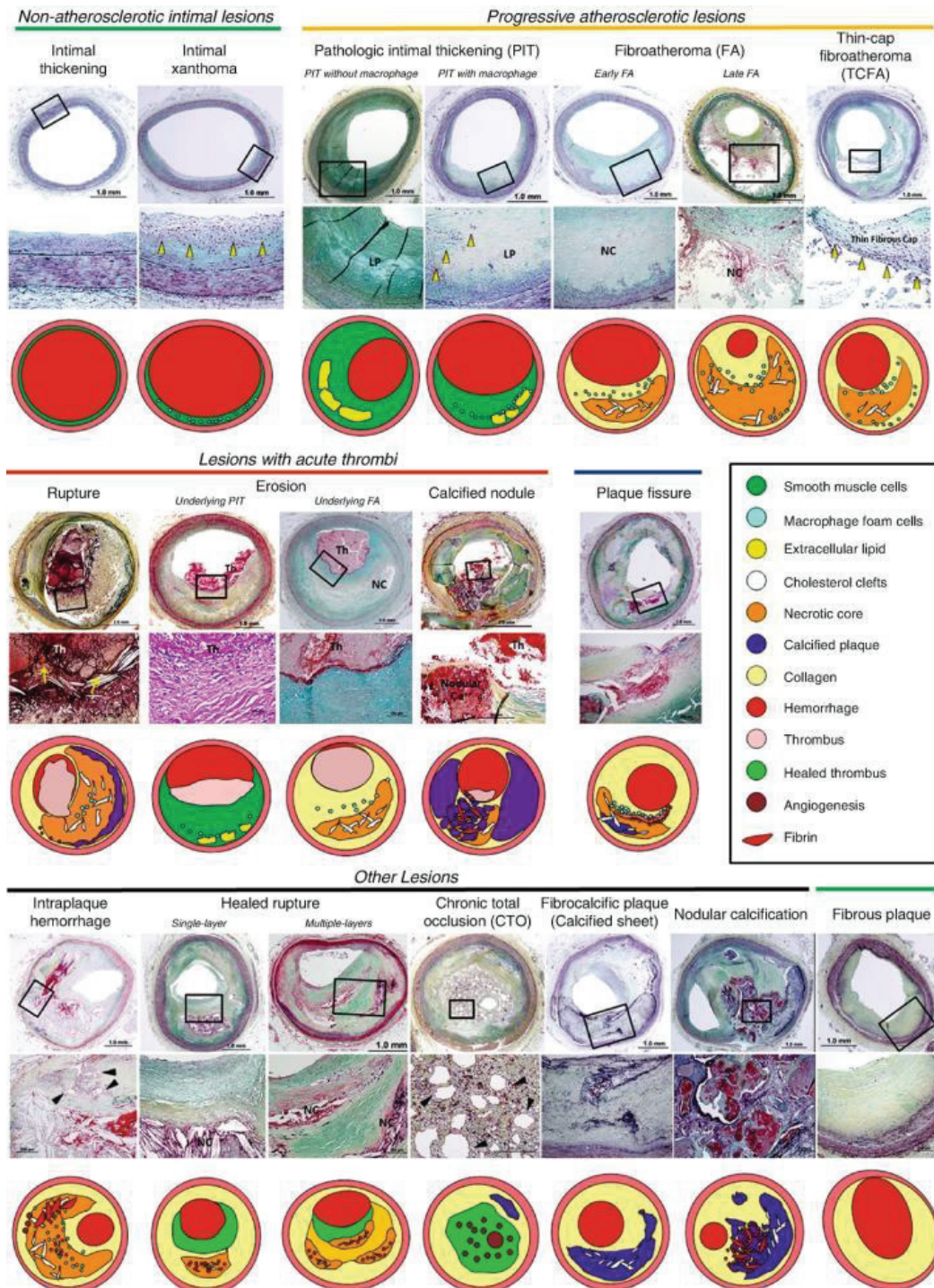


Figure 6 : Classification des lésions coronariennes humaines. Lésions intimales non athéroscléreuses, lésions athéroscléreuses progressives, lésions avec thrombus aigus, lésions avec hémorragie et/ou thrombus avec guérison et stabilisation. (Adapté de ⁴²).

- **Lésions intimaux non athéroscléreuses**

L'épaississement adaptatif de l'intima (AIT) (lésion non athéroscléreuse) et le xanthome intimal (stries graisseuses) sont considérés par certains comme les premières manifestations de la maladie athérosclérotique humaine²⁰. L'AIT se compose principalement de CML et d'une matrice de protéoglycanes avec peu ou pas d'infiltration de cellules inflammatoires, tandis que le xanthome intimal correspond à l'accumulation de macrophages majoritairement dans l'intima²⁷.

- **Lésions athéroscléreuses progressives**

L'épaississement pathologique de l'intima (PIT) représente la première lésion progressive. Elle est caractérisée par la présence d'une accumulation lipidique acellulaire située à proximité de la paroi médiale^{20,27}. Cependant, Nakagawa et al ont récemment montré qu'un léger dépôt de lipides extracellulaires au milieu de l'intima peut être observé en épaississement intimal diffus (DIT)⁴⁵. Le PIT est caractérisé par l'absence ou la présence de restes de CML dans la MEC de l'intima. La MEC est composée principalement de protéoglycanes et de collagène de type III, où la présence de protéoglycanes est connue pour être associée à la rétention de lipides sous-endothéliaux^{28,29}. La présence de macrophages dans le PIT peut indiquer un stade plus avancé de l'athérogenèse par rapport à l'absence de macrophages³⁰, mais elle peut montrer parfois la présence de macrophages qui sont généralement éloignés de la zone des amas lipidiques (plus proche de la lumière des vaisseaux).

La première lésion coronaire avancée en concordance avec la classification consensuelle de l'AHA correspond au fibroathérome^{27,22}. Cette lésion est caractérisée par la présence d'un noyau nécrotique qui est généré par l'infiltration de macrophages dans le cœur lipidique encapsulé par le tissu fibreux environnant. Le fibroathérome peut être divisé en lésions précoces et tardives. La phase précoce est caractérisée par l'infiltration de macrophages dans le cœur lipidique, associée à la perte de protéoglycane et de collagène^{30,31}. La phase tardive est caractérisée par un ensemble de débris cellulaires, une augmentation du cholestérol libre, une déplétion presque complète de la matrice extracellulaire³⁰ et l'activation de métalloprotéinases (MMP)^{27,32}.

La plaque vulnérable est composée d'un grand noyau nécrotique (généralement > 25 % de la surface de la plaque)³³ avec une coiffe fibreuse mince³⁴, une forte infiltration de macrophages, de lymphocytes et avec une présence très rare ou même l'absence de CML. Une coiffe fibreuse, riche en macromolécules de MEC telles que les collagènes (principalement de type I) recouvre généralement le noyau nécrotique. Ces caractéristiques morphologiques ont donné naissance à la nomenclature fibroathérome à coiffe mince (TCFA). Le TCFA est considéré comme la lésion précurseur de la rupture de la plaque^{27,35}. Les plaques qui se sont rompues et ont causé la mort en raison du syndrome coronarien aigu avaient tendance à avoir de minces coiffes fibreuses^{36,37}. La rupture du TCFA expose le sang avec ses facteurs de coagulation aux matériaux thrombogènes résidant dans la plaque. Ces événements

perturbateurs déclenchent le thrombus qui provoque l'ischémie caractéristique du syndrome coronarien aigu⁵. De nombreux efforts consacrés à élucider la physiopathologie de la rupture des TCFA soutiennent une image physiopathologique fondée sur une diminution de la synthèse et une augmentation de la dégradation du collagène dans la chape fibreuse de la plaque³.

- **Lésions avec hémorragie**

L'hémorragie de la plaque est un phénomène fréquent, en particulier dans les plaques avancées, causée par la rupture des vaso vasorum qui sont ramifiés à l'intérieur de la plaque³⁸. Cette hémorragie peut être ultérieurement critique dans la progression et la complication de la lésion³⁹.

- **Lésions avec thrombus aigus**

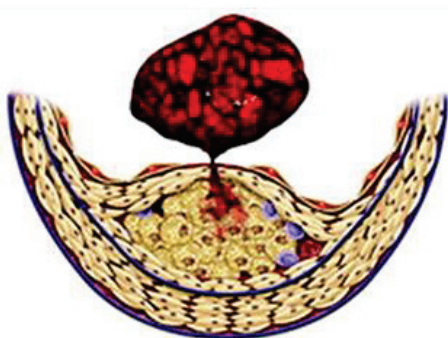
Les techniques d'imagerie *in-vivo* appliquées chez l'homme avec un syndrome coronarien aigu ont établi le rôle de la thrombose dans la pathogenèse.

Chez les patients décédant soudainement, trois causes principales de thrombus luminal peuvent être décrites²⁷ :

- 1- **Rupture** de la plaque
- 2- **Érosion** de la plaque
- 3- **Nodule** calcifié

La cause la plus fréquente de thrombose est la rupture de la plaque (plus de 60 %), l'érosion de la plaque est la deuxième (environ 35 %), alors que le nodule calcifié est une cause rare de thrombose (< 5 %)²⁷. Ces trois types de thrombose surviennent respectivement d'un fibroathérome, d'un épaissement intimal pathologique et d'une plaque calcifiée avec ou sans noyau nécrotique.

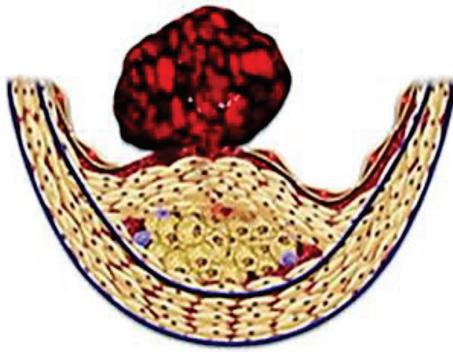
- 1- **Rupture de la plaque**



La rupture de la plaque, consiste en une lésion avec un thrombus luminal contenant un noyau nécrotique étendu avec un grand nombre de cristaux de cholestérol encapsulé par une fine chape fibreuse, infiltrée de macrophages et des cellules T. La chape fibreuse est la plus mince au site de rupture et se compose de quelques fibres de collagène avec très rarement des CML et des microcalcifications. Il y a une discontinuité évidente

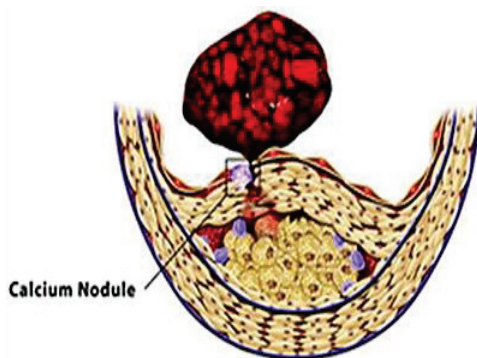
dans le capuchon fibreux permettant une communication directe entre le thrombus luminal et le cœur nécrotique sous-jacent. Le mécanisme de la rupture est mal compris, cependant il est généralement admis que les macrophages infiltrent la chape et libèrent des MMP responsables de la décomposition des collagènes^{40,41}. La rupture de la plaque est corrélée à un taux de cholestérol total élevé et un faible taux de cholestérol-HDL^{34,42}.

2- Érosion de la plaque



Le concept de la plaque vulnérable a accru l'intérêt pour une autre caractéristique anatomo-pathologique de la thrombose coronarienne, à savoir l'érosion superficielle. L'érosion de la plaque est définie comme un thrombus aigu sans rupture, mais en contact direct avec une plaque intimale riche en CML dans une matrice de protéoglycane^{43,27}. Un noyau lipidique pourrait être présent profondément dans la plaque, mais il pourrait n'y avoir aucune communication entre le thrombus et le noyau lipidique (en raison de la chape fibreuse intacte). Il y a relativement peu de macrophages et de lymphocytes adjacents au thrombus dans la majorité des érosions de la plaque, ainsi qu'une absence de signes de calcification. Les plaques compliquées par l'érosion ont tendance à être riches en matrice plutôt que dépourvues de tissu fibreux comme le cas du TCFA. Les plaques caractérisées par l'érosion, riches en CML et en protéoglycanes, sont associées à une perte endothéliale chronique suggérant que la rupture de la chape fibreuse mince recouvrant le noyau lipidique n'est pas nécessairement la seule voie commune finale dans la formation de thrombus coronaires, mais que la perte de l'endothélium peut être aussi l'une de ces voies. Les thrombus associés à l'érosion de la plaque ont tendance à présenter des thrombus blancs plus riches en plaquettes alors que les thrombus associés au TCFA sont plutôt rouges, riches en fibrine^{44,45}. Les érosions de la plaque ont tendance à provoquer une embolie plus fréquemment que la rupture de la plaque (71 %, contre 42 % respectivement)⁴⁶.

3- Nodule calcifié



Cet état représente la lésion la moins fréquente. Elle fait référence à une lésion calcifiée riche en fibres avec peu ou pas de noyau nécrotique contenant un thrombus luminal sans rupture évidente de la lésion⁴⁷. Il existe des nodules superficiels, denses et calcifiés dans l'intima, qui semblent être en éruption à travers le tissu fibreux dans la lumière, éventuellement provoquant le thrombus²⁷. Les nodules calcifiés sont associés à des cellules de type ostéoclaste et ostéoblaste²⁷. Bien que le mécanisme précis sous-jacent du nodule calcifié soit inconnu, une hypothèse de travail est que le stress mécanique pourrait fragmenter les couches de fibres calcifiées, libérant de petits nodules entourés de fibrine et qui pourraient éventuellement éclater à travers la surface de la plaque. Il est important de ne pas confondre les nodules calcifiés et la « calcification nodulaire » (mentionnée dans le chapitre 2), car cette dernière n'implique pas de thrombus luminal.

3. Mécanismes impliqués dans la formation de la plaque athéroscléreuse chez l'homme

3.1. Dérégulation du profil lipidique

Les lipoprotéines constituent la forme de transport du cholestérol et des triglycérides qu'ils soient endogènes ou exogènes. En effet les lipides ne peuvent se dissoudre dans le milieu hydrophile que constitue le sang, ils doivent s'organiser en structure sphériques amphiphiles. La surface extérieure est hydrophile, elle contient des phospholipides, du cholestérol libre et des apoprotéines. Le cœur est lipidique ou hydrophobe, il est constitué de triglycérides et de cholestérol estérifié (fig.7). En général, les cinq principales sous-fractions lipidiques d'intérêt comprennent : le cholestérol des lipoprotéines de basse densité (LDL-C), le cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL-C), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et les chylomicrons. On distingue les différents types de lipoprotéines grâce à : leur densité, leur taille et la composition en cholestérol ou triglycérides (Fig.7).

Les LDL, en tant que lipoprotéines athérogènes les plus abondantes dans le plasma, sont les principaux pourvoyeurs de cholestérol à la paroi artérielle. Chez l'homme, un taux de cholestérol plasmatique inférieur à 2 g/L est considéré comme normal, alors qu'un taux élevé correspond à une valeur supérieure à 2,4 g/L.

Les anomalies dans le profil lipidique, soit un LDL-C élevé ou un HDL-C faible, sont associées à un risque accru d'une maladie cardiovasculaire athérosclérotique (MCVAS) et d'une potentielle formation de plaque athéroscléreuse^{48,49}.

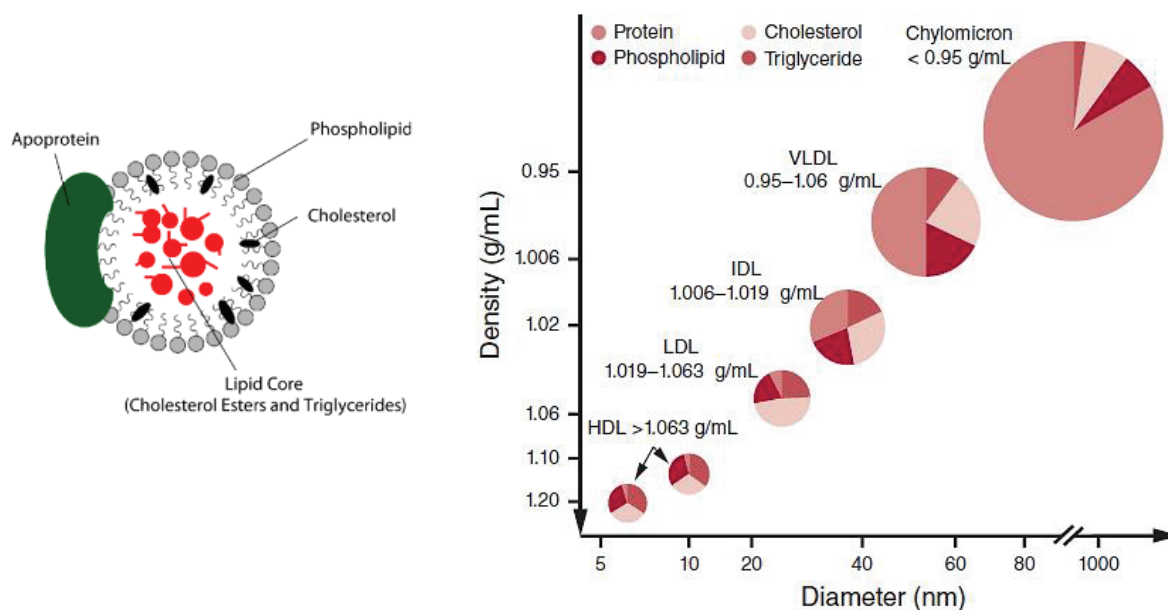


Figure 7 : Caractéristiques des lipoprotéines. (Tiré de Wikipédia).

3.2. Initiation de la plaque athéroscléreuse par les LDL

3.2.1. Pénétration, accumulation et dysfonction endothéliale

Le développement de l'athérosclérose est déclenché par l'entrée et la rétention sous-endothéliale des lipoprotéines (en particulier des LDL) de la circulation sanguine^{50,51,52} dans la paroi artérielle. Ce phénomène de rétention dans la paroi artérielle semble impliquer des interactions entre l'apolipoprotéine B (ApoB), constituant des LDL, avec les protéoglycanes de la matrice⁵³. L'accumulation sous-endothéliale est plus grande lorsque les niveaux de LDL circulant sont élevés.

Dans des conditions physiologiques, l'endothélium forme une barrière en raison de la présence des jonctions cellulaires spécialisées qui régulent sélectivement le passage des molécules et des cellules entre la circulation sanguine et les tissus par voie paracellulaire⁵⁴. L'endothélium est perméable à l'eau et aux petites molécules d'un diamètre inférieur à 6 nm, mais presque imperméable aux macromolécules y compris les lipoprotéines. Les cellules endothéliales dans les régions de ramification ou de courbure artérielle (par exemple l'arche aortique chez la souris), où l'écoulement est perturbé, ont des formes polygonales sans aucune orientation particulière. Ces dernières zones présentent une perméabilité accrue aux macromolécules telles que les LDL et sont des sites préférentiels pour la formation de la lésion athéroscléreuse⁵⁵. Le transport des LDL à travers cette couche endothéliale est activement contrôlé par les cellules endothéliales via la voie transcellulaire ou transcytose⁵⁶.

La transcytose peut être séparée en voies directes et indirectes (Fig. 8) :

- Les voies de transcytose indirecte sont également spécifiques de récepteurs et reposent sur l'interaction des molécules et de leurs récepteurs endogènes, qui seront endocytés dans les endosomes précoces, transférés vers les endosomes de recyclage et exocytés du côté opposé à la couche endothéliale. Par exemple, les LDL peuvent transcytoser à travers la couche endothéliale en se liant aux récepteurs des LDL (LDLr)⁵⁷.
- Les voies de transcytose directe impliquent le transport direct des molécules (LDL) via les cavéoles associées aux « activin receptor-like kinase 1 (ALK1) »⁵⁸ et aux récepteurs phagocytaires B1 (SR-B1). Les vésicules formées entrent du côté luminal de la cellule et fusionnent avec la membrane plasmique du côté interstitiel.

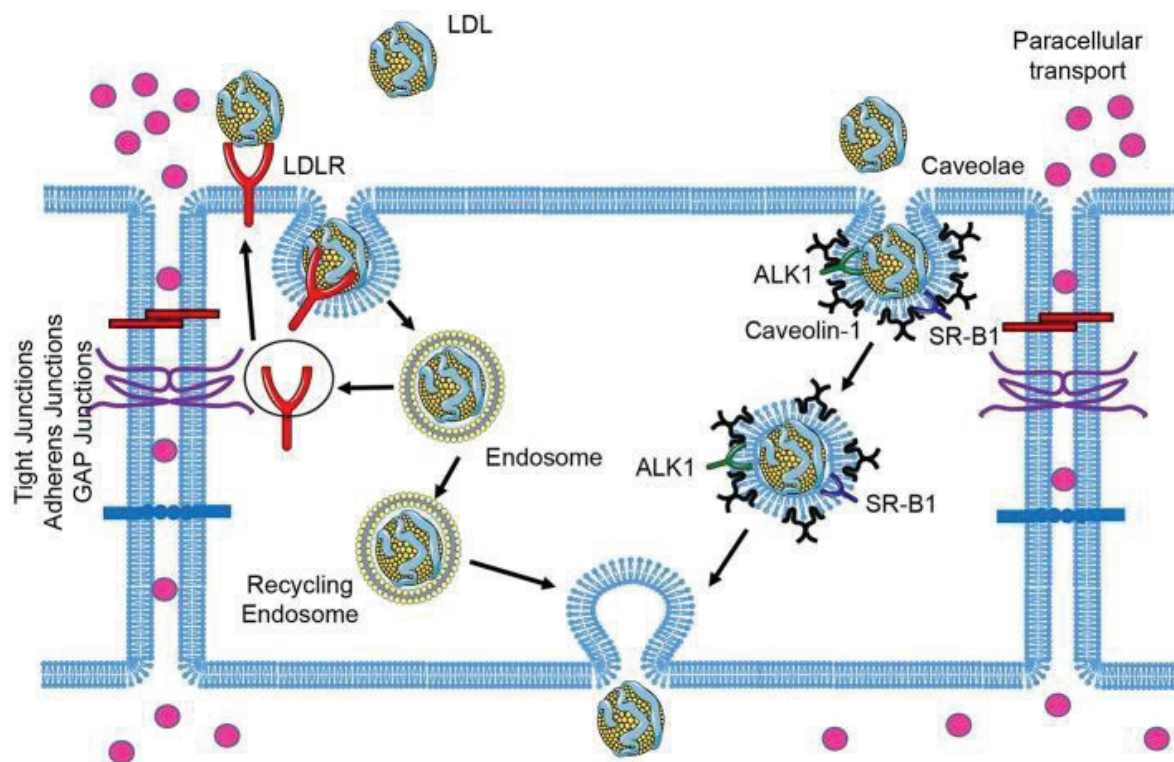


Figure 8 : Schéma de la transcytose des LDL par les cellules endothéliales.

(Adapté de ⁷⁴).

3.2.2. Devenir des LDL

Les lipoprotéines liées à la matrice extracellulaire de la couche intimale sont susceptibles d'être modifiées par des agents oxydants intimaux, des protéases et des lipases^{59,60,61}. En effet le blocage de la rétention des LDL par des anticorps générés contre des protéoglycanes de type glycosaminoglycanes sulfatés diminue la modification des LDL ainsi que l'athérosclérose⁶². Les actions athérogènes des LDL dans le tissu artériel ont de multiples origines (Fig. 9). Globalement, celles-ci englobent^{63,64,65} :

1- La formation de cellules spumeuses dérivées de macrophages lors de l'absorption phagocytaire de particules de LDL agrégées, ou LDL dans lesquelles les composants lipidiques et/ou protéiques ont subi une modification covalente, déclenchant l'absorption par des récepteurs phagocytaires. L'agrégation peut se produire par des mécanismes non enzymatiques ou enzymatiques. L'oxydation des lipides des LDL (phospholipides, esters de cholestérol et cholestérol) peut se produire de manière enzymatique, par exemple par la myéloperoxydase (MPO), ou de manière non enzymatique (par exemple par des ROS libérées par des cellules endothéliales activées ou par des macrophages).

2- La libération de lipides pro-inflammatoires bioactifs (par exemple des phospholipides oxydés), suite à l'oxydation, qui peuvent exercer des actions à la fois locales et systémiques.

3- La formation de dépôts lipidiques extracellulaires, notamment de cristaux de cholestérol, lors de l'oxydation des LDL.

4- L'induction d'une réponse immunitaire innée, impliquant des motifs moléculaires associés aux dégâts (par exemple, DAMP). Les DAMP favorisent le recrutement des cellules immuno inflammatoires (monocytes-macrophages, neutrophiles et lymphocytes), conduisant à une inflammation locale et potentiellement chronique qui peut induire la mort cellulaire, par apoptose ou bien nécrose, conduisant ainsi à la formation du noyau nécrotique.

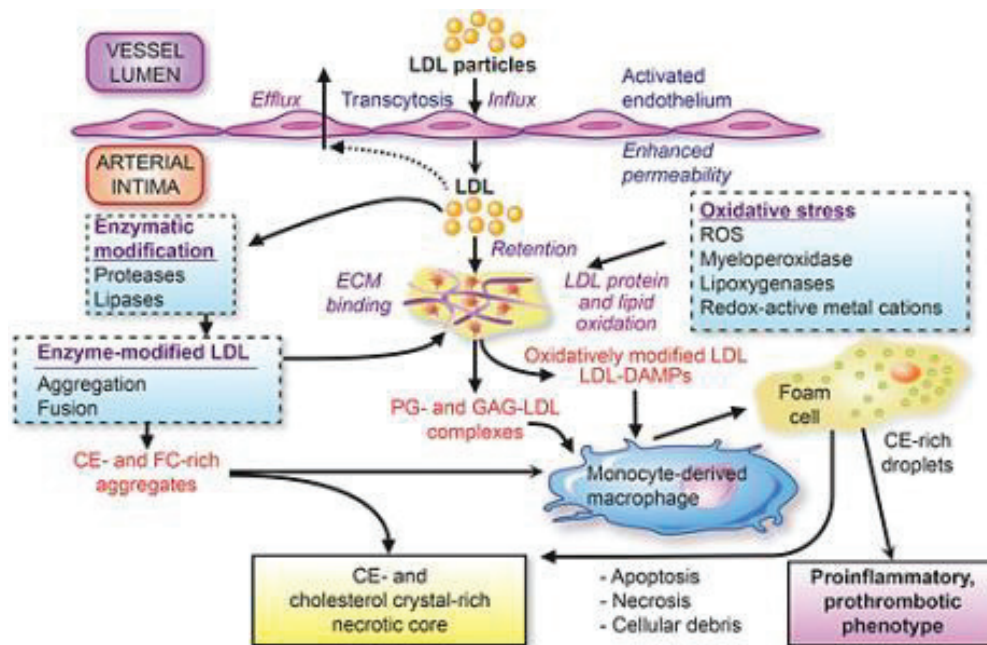


Figure 9 : LDL comme principal moteur de l'athérogenèse. Principales caractéristiques de l'influx et de la rétention des LDL dans l'intima artérielle, avec les voies de modification qui en résultent. (Adapté de ⁶⁶).

3.2.3. Conséquences de l'accumulation des LDL

Les macrophages accumulent du cholestérol libre dans les lésions athéroscléreuses avancées, ce qui entraîne l'apoptose et la progression de l'athérosclérose^{67,68}

Le cholestérol dans les particules LDL existe sous une forme estérifiée (ESC), mais c'est le processus conduisant à l'accumulation de cholestérol libre (FRC) dans la paroi artérielle qui prédispose à la formation de microcristaux de cholestérol intracellulaire (cc). L'ester hydrolase de cholestérol (CHE) convertit l'ESC en FRC, tandis que l'acyl-coenzyme A cholestérol acyl transférase 1 (ACAT-1) convertit le FRC en son état estérifié. Les cellules possèdent de multiples mécanismes pour empêcher l'accumulation de l'excès de cholestérol libre, y compris l'activation de l'estérification du cholestérol via l'ACAT-1 et l'efflux du cholestérol via les HDL^{69,67}. Dans les lésions athéroscléreuses avancées, un déséquilibre dans l'un de ces mécanismes conduit à l'accumulation de FRC dans les macrophages, d'où la mort cellulaire.

Freng et al ont suggéré que l'accumulation intracellulaire de grandes quantités d'ester de cholestérol dans les macrophages spumeux des plaques athérosclérotiques précoces n'est pas cytotoxique et n'induit pas l'apoptose des macrophages, et que c'est plutôt le cholestérol libre accumulé dans le réticulum endoplasmique qui est le responsable de la cytotoxicité et l'apoptose des macrophages⁷⁰. Plusieurs autres études ont évalué les effets de l'augmentation de la CHE et du blocage de l'ACAT-1 sur l'athérosclérose. Par exemple, Zhao et al ont étudié l'effet de l'amélioration de l'activité de ces enzymes dans les macrophages en utilisant des souris athérosclérotiques (*Ldlr*^{-/-}) transgéniques qui surexpriment CHE. Ils ont démontré une réduction de la taille du noyau nécrotique et une augmentation du nombre de cellules viables en présence d'un taux de HDL normal. L'activité CHE accrue n'a pas entraîné d'accumulation de FRC en raison de l'augmentation du transport inverse du cholestérol hors des tissus via les HDL⁷¹.

L'accumulation de FRC dans les cellules conduit à la cristallisation du cholestérol et à la mort cellulaire. Une perturbation de l'homéostasie du cholestérol peut entraîner une accumulation de cristaux dans le noyau nécrotique, provoquant un stress mécanique et une rupture de la plaque^{72,73,74,75}. Une conséquence cliniquement importante de l'accumulation de cristaux est l'activation de l'inflammasome, plateforme de signalisation multiprotéique assemblée par des récepteurs cytosoliques de la famille des NLR (*nucleotide-binding domain leucine-rich repeat*) et *pyrin-containing receptor 3* pour NLRP3, qui clive la pro-IL-1 β en sa forme biologiquement active, l'IL-1 β ⁷⁶. L'atténuation du stockage du cholestérol et l'amélioration des voies d'efflux du cholestérol peuvent favoriser la résolution de l'inflammation de la plaque⁷⁷.

3.3. L'Inflammation, de l'initiation à la progression de la plaque athéroscléreuse

Il a été prouvé que l'inflammation joue un rôle important dans l'initiation et la progression de la plaque athéroscléreuse⁷⁸.

Durant l'athérosclérose, les premières causes se concentrent sur des lésions endothéliales, un métabolisme lipidique anormal (comme déjà mentionné dans les paragraphes ci-dessus), alors que le processus athérogène s'accompagne ensuite de modifications inflammatoires induites par l'activation de la barrière endothéliale⁷⁹. Lorsque les cellules endothéliales sont activées, elles expriment divers facteurs, en particulier la protéine chimioattractrice monocytaire, l'interleukine 8 (IL-8), la molécule d'adhésion vasculaire (VCAM), la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM), la sélectine E, la sélectine P. Ces nombreux facteurs attirent les lymphocytes, les neutrophiles et les monocytes qui se lient à l'endothélium, infiltrant la paroi artérielle et induisent une réponse inflammatoire dans les plaques athérosclérotiques⁸⁰.

3.3.1. L'inflammation locale et systémique dans l'athérosclérose

Le processus inflammatoire dans les artères athéroscléreuses peut entraîner une augmentation des taux sanguins de cytokines inflammatoires et de protéine C-réactive (CRP) (protéine libérée par le foie en cas d'inflammation systémique). Les taux de CRP et d'interleukine-6 sont élevés chez les patients souffrant d'angor instable et d'infarctus du myocarde, prédisant un mauvais pronostic⁸¹. Les taux d'autres marqueurs inflammatoires sont également élevés chez ces patients, y compris le fibrinogène, l'IFN- γ , l'IL-7, ou encore l'IL-8⁸². Par conséquent, les taux élevés de CRP chez les patients atteints de syndrome coronarien aigu reflètent probablement l'inflammation de l'artère coronaire plutôt que l'ischémie du myocarde⁸³. Collectivement, ces résultats suggèrent que l'activation inflammatoire dans les artères coronaires déclenche des syndromes coronariens aigus, avec des niveaux circulants de marqueurs inflammatoires reflétant l'évolution clinique de la maladie. Dans ce contexte, les résultats de l'étude CANTOS (*Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Outcome Study*) qui a examiné l'effet du canakinumab (anti-IL-1 β) chez les patients avec un syndrome coronarien aigu et un niveau CRP élevé⁸⁴, a montré que les niveaux de CRP et d'IL-6 sont significativement réduits suite au traitement, avec une diminution de la mortalité, mais sans modifier les concentrations de LDL⁸⁴. Cette étude a fourni une preuve importante sur la contribution de la voie de l'IL-1 dans l'instabilité de la plaque athéroscléreuse, et que l'inhibition de cette voie a le potentiel d'améliorer le devenir des patients atteints d'une athérosclérose coronarienne⁸⁴.

3.3.2. Les neutrophiles

a) Généralités

Les neutrophiles appartiennent à la famille des leucocytes polymorphonucléaires, car ils ont un noyau divisé en plusieurs segments. Parmi les leucocytes, ces cellules sont les plus fréquentes dans la circulation sanguine (jusqu'à 75 % de la population totale)⁸⁵. La durée de vie de ces cellules est relativement courte dans la circulation (quelques heures à quelques jours), leur renouvellement est rapide ; c'est une des raisons pour lesquelles leur rôle dans le processus pathologique de l'athérosclérose n'a pas été bien clarifié jusqu'à aujourd'hui⁸⁶.

b) Implications dans l'athérosclérose

Des preuves s'accumulent selon lesquelles l'hyperlipidémie active non seulement les cellules monocytaires, mais induit également l'activation des neutrophiles^{87,88}. Avec l'avancement des techniques de marquage fluorescent spécifiques des neutrophiles ces dernières années, un certain nombre d'études ont démontré l'accumulation de neutrophiles dans les plaques athéroscléreuses^{89,90}. En fait, la neutrophilie induite par l'hyperlipidémie ou l'hypercholestérolémie s'est avérée être un stimulus déclencheur du développement de la plaque⁸⁸. Alors que le nombre total de neutrophiles dans la plaque est minime, les emplacements des infiltrations maximales de neutrophiles sont corrélés avec les régions ayant la densité de monocytes la plus élevée⁹⁰. Les neutrophiles peuvent jouer un rôle direct dans

la formation des lésions athéroscléreuses et peuvent également participer à l'évolution et à la complication des lésions⁹¹. De nombreuses recherches ont été entreprises pour comprendre les mécanismes par lesquels les interactions neutrophiles-monocytes contribuent à la formation des lésions^{92,89}. Lors de la dégranulation, les neutrophiles activés libèrent de grandes quantités de divers facteurs cytotoxiques et destructeurs capables d'induire des dommages dramatiques au tissu vasculaire. Par exemple, la MPO contribue à la formation de ROS, qui à leur tour peuvent être impliqués dans la modification oxydante des LDL et l'activation des cellules endothéliales, favorisant ainsi un environnement pro-athérogène⁹³. Les protéases dérivées de granules tels que la MMP-1, la MMP-2, la MMP-9, l'élastase ou encore la cathepsine participent à la dégradation de la matrice extracellulaire et peuvent donc contribuer au remodelage vasculaire, à l'amincissement de la coiffe fibreuse et à l'athérombose^{94,95}, qui constitue la complication thrombotique majeure de l'athérosclérose.

Il convient de souligner que les neutrophiles, les monocytes et les macrophages coopèrent dans l'induction et la propagation de l'inflammation athéroscléreuse. Les neutrophiles attirent et guident les monocytes inflammatoires vers les plaques. La déplétion des neutrophiles entraîne une diminution du nombre de monocytes/macrophages dans les lysats aortiques de souris⁸⁸. Les neutrophiles libèrent un certain nombre de protéines telles que l'azurocidine, la cathepsine G, les α -défensines et la LL-37 qui présentent une activité chimiotactique directe sur les monocytes⁹⁶.

En plus de la modulation via la libération contrôlée de produits granulaires, les neutrophiles activés peuvent libérer leur contenu cytoplasmique et extruder leur ADN dans un processus appelé NETose (forme spécialisée de mort cellulaire)^{5,97} qui participe également à l'athérombose⁹⁸. Les « *neutrophil extracellular trap* » (NET) sont des structures en réseau, décorées avec de nombreux médiateurs effecteurs, y compris des histones, de multiples protéinases et l'enzyme pro-oxydante MPO (Fig.10). La formation de NET est capable d'amorcer l'activation des macrophages, potentialisant la formation de la plaque athéroscléreuse murine^{99,100}. Un nombre accru de neutrophiles en NETose ont été trouvés adhérant à la lumière vasculaire dans des modèles murins d'athérosclérose, ainsi qu'identifiés dans des plaques athéroscléreuses prélevées sur des artères humaines¹⁰¹. Pour examiner les effets de la formation de NET par les neutrophiles activés par les cristaux de cholestérol sur l'athérogenèse, des souris ApoE^{-/-} nourries avec une alimentation riche en graisses incapables de subir une formation de NET, présentaient des lésions athéroscléreuses 3 fois plus petites^{102,101}. En outre, les NET se sont avérés être un moteur crucial dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et pro-athérogènes, telles que l'IL-1 β et l'IL-6, ces cytokines étant libérées par les monocytes recrutés et exposés aux NET¹⁰³.

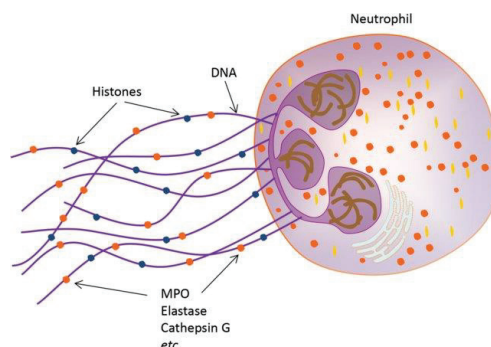


Figure 10 : Structure de « neutrophil extracellular trap » (NET). (Tiré de wikipédia).

3.3.3. Macrophages

a) Polarisation des macrophages

Les macrophages sont caractérisés par une remarquable plasticité qui leur permet de répondre efficacement aux modifications de leur environnement. Fonctionnellement, plusieurs types de macrophages se différencient à partir des monocytes *in-vitro* :

M1 pour « *classically activated macrophages* »

Ces macrophages nécessitent des facteurs comme par exemple le lipopolysaccharide (LPS) bactérien pro-inflammatoire ou l'INF- γ pour que les cellules de la moelle osseuse se différencient. L'INF- γ est une cytokine produite *in-vivo* par les LT helper 1 (Th1) et les cellules NK (Natural Killer). Les macrophages M1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 d'où leur nom de macrophages « pro-inflammatoires ».

M2 pour « *alternatively activated macrophages* »

Des études *in-vitro* ont permis de sous-diviser les macrophages M2 en plusieurs classes : les M2a, M2b et M2c. Les cytokines IL-4 et IL-13 produites par les LT helper 2 (Th2) activent les M2a. Ces macrophages produisent eux-mêmes de l'IL-4 et sécrètent de la fibronectine, une glycoprotéine présente dans la MEC et qui joue un rôle clé dans l'adhésion des cellules à la MEC. L'IL-4 stimule l'activation de l'arginase du macrophage, qui augmente la production de la MEC. Ce sécrétome suggère un rôle des M2a dans le processus de réparation tissulaire. Ils ont donc été également appelés « macrophages de cicatrisation ». Les M2b sont générés par une stimulation de l'IL-1 β ou du LPS. Ces cellules sécrètent une cytokine anti-inflammatoire, l'IL-10 qui permet d'empêcher la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par les cellules voisines. Les M2c sont activés par l'IL-10 et sécrètent également des niveaux élevés d'IL-10. Les M2b et les M2c sont appelés « macrophages régulateurs ».

Cette définition de l'hétérogénéité des macrophages est bien définie pour les études *in-vitro* mais devrait être utilisée avec prudence dans un contexte *in-vivo*. En effet, la culture *in-vitro* génère des phénotypes bien distincts de macrophages mais les macrophages isolés des tissus périphériques semblent plus complexes, avec des phénotypes mixtes.

L'hétérogénéité des macrophages a été montrée au niveau des plaques athérosclérose murines et humaines avec la présence des marqueurs M1/M2^{104,105,106}. L'origine de ces macrophages M1/M2 dans la plaque est encore un sujet de débat. Historiquement, leur origine a été définie comme venant entièrement des monocytes sanguins dans la circulation, puis récemment leur origine a pu aussi être montrée à partir de cellules musculaires lisses¹⁰. Quelle que soit leur origine, ces macrophages orchestrent plusieurs fonctions biologiques, dont l'efflux de cholestérol, l'apoptose, la phagocytose, l'efferocytose, la prolifération, la migration, la sécrétion de molécules pro-inflammatoires et anti-inflammatoires en réponses à divers signaux micro-environnementaux (Fig.11).

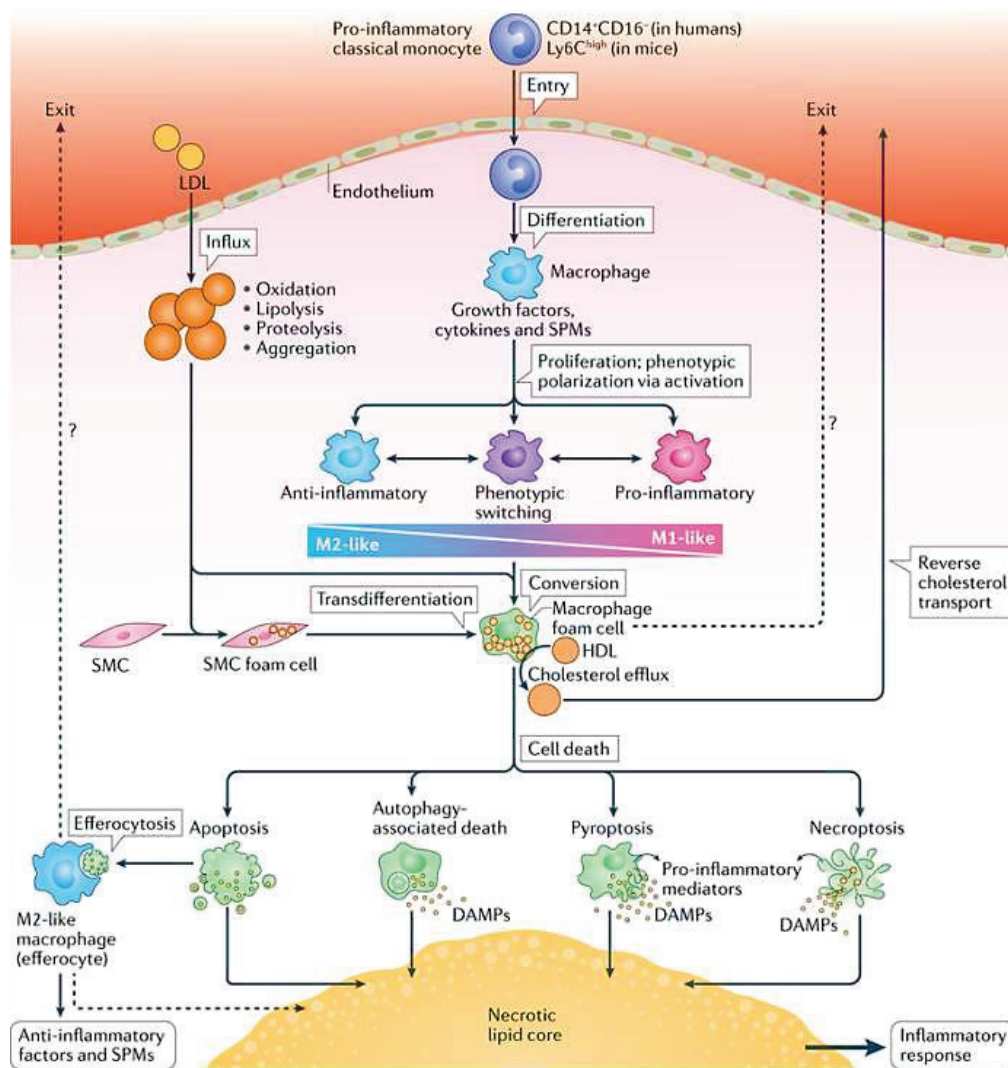


Figure 11 : Cycle de vie des macrophages dans la plaque athéroscléreuse. (Adapté de ¹⁰⁷).

Dans les lésions avancées, la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 est cohérente avec l'environnement pro-inflammatoire des lésions. En effet la présence des lipides oxydés au niveau des plaques, permettrait l'activation des macrophages de type M1 et

la production de cytokines inflammatoires. La formation des cellules spumeuses a donc été associée à un phénotype pro-inflammatoire des macrophages de type M1. Néanmoins, il a été montré que les oxystérols, ligands des récepteurs nucléaires LXR β et LXR α et des récepteurs PPAR, sont également capables d'inhiber l'expression des gènes pro-inflammatoires dans les macrophages, ce qui favoriserait la polarisation de type M2^{108,109,110}.

Récemment deux autres populations de macrophages ont été décrites, les macrophages Mox (Mox) et les macrophages M4. Les Mox sécrètent l'enzyme hème oxygenase-1 (HO-1) et seraient activés par les phospholipides oxydés présents sur les ox-LDL. Ces macrophages ont été trouvés dans les aortes de souris Ldlr^{-/-} et constitueraient 30 % de la population totale de macrophages aortiques¹¹¹. Ces macrophages auraient un phénotype pro-inflammatoire puisqu'ils augmentent l'expression de gènes comme l'IL-1 β mais de manière moindre que les M1. Dans cette étude, il est également démontré que ces Mox ont une capacité de phagocytose et de migration diminuée par rapport aux M1 et M2.

In-vitro, la différenciation des macrophages avec la chimiokine CXCL4 induit un phénotype macrophagique distinct des macrophages M1 et M2. Ces cellules ont été classées comme macrophages M4. De manière intéressante une déficience en CXCL4 permet de diminuer la taille des lésions, suggérant un rôle pro-athérogène de ces macrophages M4¹¹². Bien que la capacité des macrophages M1, M2 et Mox à interchanger leurs phénotypes ait été montrée *in-vitro*, la polarisation vers le phénotype M4 semble irréversible¹¹².

Si cette capacité de changement phénotypique existe *in-vivo* dans les plaques athéroscléreuses, la question suivante peut être posée : pourquoi l'inflammation locale persiste dans les stades avancés de l'athérosclérose ?

b) Implications dans l'élimination du cholestérol

Deux mécanismes sont possibles pour l'élimination du cholestérol de la plaque athéroscléreuse :

- 1- Les particules de HDL peuvent induire un efflux de cholestérol à partir des macrophages spumeux, induisant ainsi le processus de transport inverse du cholestérol de la plaque athéroscléreuse vers la circulation¹¹³.
- 2- Les macrophages spumeux quittent la plaque athéroscléreuse et transportent leur charge en cholestérol dans la circulation¹¹⁴.

Par conséquent, un déséquilibre dans ces mécanismes permet à toutes les cellules chargées en ester de cholestérol, indépendamment de leur origine ou de leur mode de mort, de contribuer à la génération et la croissance d'un noyau lipidique nécrotique ou nécroptotique pro-inflammatoire.

c) Efferocytose et implications dans les différents stades de l'athérosclérose

L'élimination rapide et efficace des cellules mortes par efferocytose est essentielle pour maintenir l'homéostasie tissulaire. L'efferocytose est stimulée par l'interaction entre les

récepteurs phagocytaires « Scavenger » (par exemple, SR-B1 et LRP-1 ; CD36) et les ligands des cellules apoptotiques (par exemple « eat-me »)¹¹⁵.

L'infiltration de macrophages dans les lésions PIT est une étape précoce et importante vers la progression des lésions athéroscléreuses en fibroathéromes. L'accumulation de macrophages chargés de lipides se produit près de la lumière et a finalement un impact sur la progression des lésions athéroscléreuses (Fig.12). Dans les stades initiaux, des études dans des modèles murins montrent que même si l'apoptose des macrophages se produit dans les lésions précoces, une efferocytose efficace rend ce processus éventuellement bénéfique avec une diminution de la progression des lésions¹¹⁶.

Avec la progression vers les stades tardifs (fibroathéromes), le processus efferocytotique est défectueux, ce qui entraîne l'accumulation des macrophages apoptotiques^{117,118} susceptibles de subir une nécrose secondaire²⁴ (Fig.12).

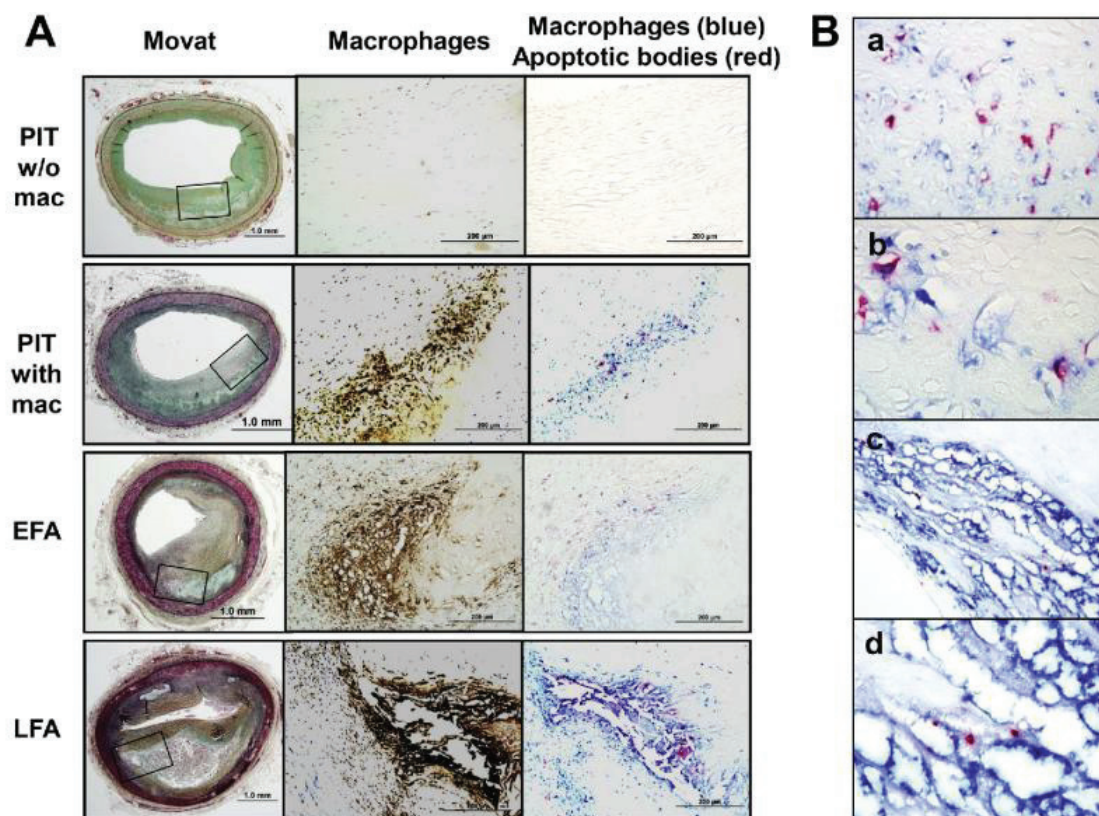


Figure 12 : Coupes histologiques représentatives des artères coronaires humaines, montrant une augmentation de l'infiltration des macrophages et des corps apoptotiques avec la progression de la plaque. (A) la colonne du milieu, montre l'immunocoloration des macrophages (CD68, brun), tandis que la colonne de droite montre une double coloration pour les macrophages (CD68, bleu) et les corps apoptotiques (rouge). **(B)** la double immunocoloration a démontré que la plupart des corps apoptotiques sont co-localisés avec les macrophages et qu'ils sont phagocytés par ces derniers dans la lésion PIT, alors que la proportion des corps apoptotiques libres augmente dans les fibroathéromes tardifs où les corps apoptotiques phagocytés ont diminué. (Adapté de ¹¹⁹).

Une efferocytose déficiente peut résulter du stress oxydant des phagocytes, dû à une réduction d'efflux de cholestérol après l'engloutissement des cellules apoptotiques¹²⁰. Plusieurs études ont démontré que les macrophages nécroptiques sont moins efficacement efferocytés que les cellules apoptotiques^{121,115}, ce qui suggère que cela peut contribuer directement à l'accumulation des débris nécrotiques dans la plaque athéroscléreuse. Schrijvers et al ont montré que les fibroathéromes tardifs dans les plaques carotidiennes humaines contenaient un nombre substantiel de corps apoptotiques dans le noyau nécrotique qui n'étaient pas phagocytés par les macrophages¹¹⁸. Otsuka et al ont suggéré qu'un processus similaire à celui observé dans les modèles murins se produit également dans les lésions coronaires humaines et que la progression de la plaque et la formation du noyau nécrotique sont initiées à partir de la collection de corps apoptotiques¹¹⁹.

Il a également été suggéré que les macrophages dans les stades tardifs contribuent à l'amincissement de la coiffe fibreuse et à la rupture de la plaque par la sécrétion de métalloprotéinases matricielles³, bien que cela ait été difficile à prouver dans les modèles murins car les souris ne présentent pas le type de lésion avec la rupture de la plaque qui se produit chez l'homme¹²². Une hémorragie intra-plaque est parfois associée à une accumulation de macrophages dans les lésions humaines avancées¹²³ par la sécrétion de protéases¹²⁴.

d) Mécanismes régulant la quantité de macrophages dans la plaque athéroscléreuse

Les études portant sur les macrophages sont souvent limitées à la quantification des macrophages totaux sur des sections de la crosse aortique. Or, le nombre de macrophages dans les plaques varie en permanence. Les nouvelles avancées techniques ont permis de mieux comprendre la dynamique des macrophages au sein des lésions.

Aujourd'hui, il semble que le nombre de macrophages présents dans les lésions d'athérosclérose soit déterminé par le recrutement des monocytes, la prolifération des macrophages, la sortie des macrophages et enfin la mort cellulaire.

3.3.4. Formes de mort dans la plaque athéroscléreuse

Bien que les mécanismes précis qui régulent la mort des macrophages restent à élucider, des études suggèrent que dans les lésions précoces riches en macrophages, c'est-à-dire dans les stries lipidiques, les macrophages apoptotiques sont efficacement éliminés par efferocytose, empêchent ainsi l'accumulation de cœur nécrotique et régulent l'inflammation¹²⁵.

a) Apoptose

Le terme apoptose a été inventé lors des travaux de Kerr et al en 1972¹²⁶. L'apoptose implique des voies de signalisation étroitement contrôlées et régulées qui induisent un rétrécissement du noyau, une dégradation du contenu cellulaire, une génération de corps

apoptotiques mais avec une membrane plasmique intacte. Les cellules apoptotiques envoient des signaux non-inflammatoires et des signaux inducteurs de leur efferocytose tels que « eat-me » et « Find-me »¹²⁷. L'apoptose peut être déclenchée par deux voies aboutissant à l'activation des caspases et ensuite à la mort cellulaire^{128,129} :

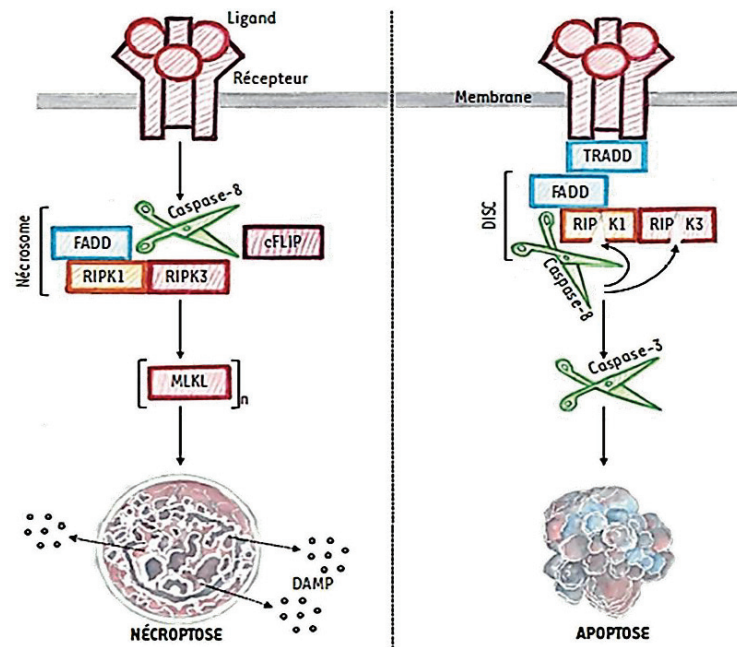


Figure 13 : Activation de l'apoptose et de la nécroptose menant à la mort cellulaire. Panneau de droite : après fixation du ligand, le domaine intracytoplasmique du récepteur recrute les protéines adaptatrices TRADD et FADD. Cette dernière interagit avec la pro-Caspase-8 pour former une plateforme de signalisation appelée le complexe de signalisation induisant la mort (DISC). La pro-Caspase-8 s'active par auto-clivage puis clive la pro-Caspase-3 qui va déclencher l'apoptose. Dans le même temps, les kinases RIPK1 et RIPK3 sont clivées par la Caspase-8 pour prévenir la formation du nécrosome. L'apoptose est représentée schématiquement avec les corps apoptotiques de la cellule mourante. À noter que les membranes plasmiques restent intactes durant tout le processus de mort cellulaire. Panneau de gauche : la nécroptose est initiée par le récepteur seulement si la Caspase-8 se trouve inhibée. Dans ce cas, cFLIP forme un hétérodimère avec la pro-Caspase-8 ce qui a pour conséquence de prévenir son activité protéolytique. Dans ces conditions, l'activation du récepteur induite par la fixation du ligand permet la formation du nécrosome, un complexe de signalisation comprenant l'adaptateur FADD et les kinases RIPK1 et RIPK3. Le nécrosome induit la mort cellulaire via la phosphorylation des oligomères de MLKL capables de créer des pores dans la membrane plasmique. La formation des pores serait responsable du relargage de médiateurs de l'inflammation, les DAMP. FADD : Fas associating protein with death domain ; TRADD : TNFR1-associated death domain protein ; RIPK1 : receptor-interacting protein kinase 1 ; RIPK3 : receptor-interacting protein kinase 3 ; cFLIP : cellular FLICE-like inhibitory protein ; MLKL : mixed lineage kinase domain-like protein ; (MLKL)_n : oligomère de MLKL ; DAMP : damage-associated molecular patterns ; DISC : death-inducing signaling complex. (Adapté de ¹³⁰).

- La voie apoptotique extrinsèque, est initiée lors de l'activation des récepteurs de mort [par exemple, superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFR), ou Fas-R]. Ces récepteurs sont activés lors de la fixation de leur ligand à la membrane cellulaire, conduisant au recrutement d'un complexe multiprotéique appelé le DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), comportant notamment la pro-caspase-8. Ces caspases initiatrices activent alors les caspases exécutrices (ou effectrices), comme les caspases 3/6/7, et entraînent l'apoptose des cellules (Fig.13).

- La voie apoptotique intrinsèque repose sur la perte d'intégrité membranaire des mitochondries. Elle est initiée par divers stress ou déclencheurs intracellulaires, comme par exemple les dommages à l'ADN (DAMP), qui induisent la translocation des protéines pro-apoptotiques vers la membrane externe mitochondriale. La perte de potentiel transmembranaire mitochondrial ainsi favorisée permet la libération dans le cytosol de ces protéines, en particulier le cytochrome c. Le cytochrome c'est à l'origine de l'activation de la caspase-9 qui active à son tour la caspase-3 responsable de l'apoptose des cellules.

b) Nécrose et nécroptose

Lorsque les lésions progressent et continuent d'accumuler du cholestérol libre, des lipoprotéines oxydées et des acides gras, les macrophages subissent une mort cellulaire apoptotique continue et accrue. Ce phénomène étant combiné à une efferocytose défectueuse, les cellules apoptotiques restent dans l'intima et subissent finalement une nécrose secondaire (Fig.14). Jusqu'à la dernière décennie, la nécrose était considérée comme un processus non régulé par lequel ces cellules apoptotiques perdent l'intégrité de leur membrane et libèrent tout leur contenu cellulaire, amplifiant la réponse inflammatoire et le développement des lésions athéroscléreuses^{117,125}.

Cependant, la découverte par criblage d'une classe d'inhibiteurs (nécrostatines) des protéines kinases RIP1 et RIP3 a permis de mettre en évidence un type de nécrose programmée appelé nécroptose^{131,132,133}.

La nécroptose est définie comme une voie de mort cellulaire régulée qui est indépendante des caspases et dépendante de la voie de signalisation RIP1, RIP3 et MLKL¹³⁴. L'activation de la nécroptose entraîne un gonflement cytoplasmique, une perte d'intégrité de la membrane et la libération de tout le contenu intracellulaire¹³⁵. La nécroptose est initiée par la phosphorylation de RIP3 (nécrosome complexe I) par RIP1, qui à son tour, phosphoryle les protéines MLKL (*mixed lineage kinase domain-like protein*). En réaction, les protéines MLKL s'oligomérisent en complexes multimères (nécrosome complexe II) qui perforent la membrane cellulaire et permettent la libération du contenu cellulaire (par exemple les DAMP et cytokines)¹³⁶ (Fig.13, 14).

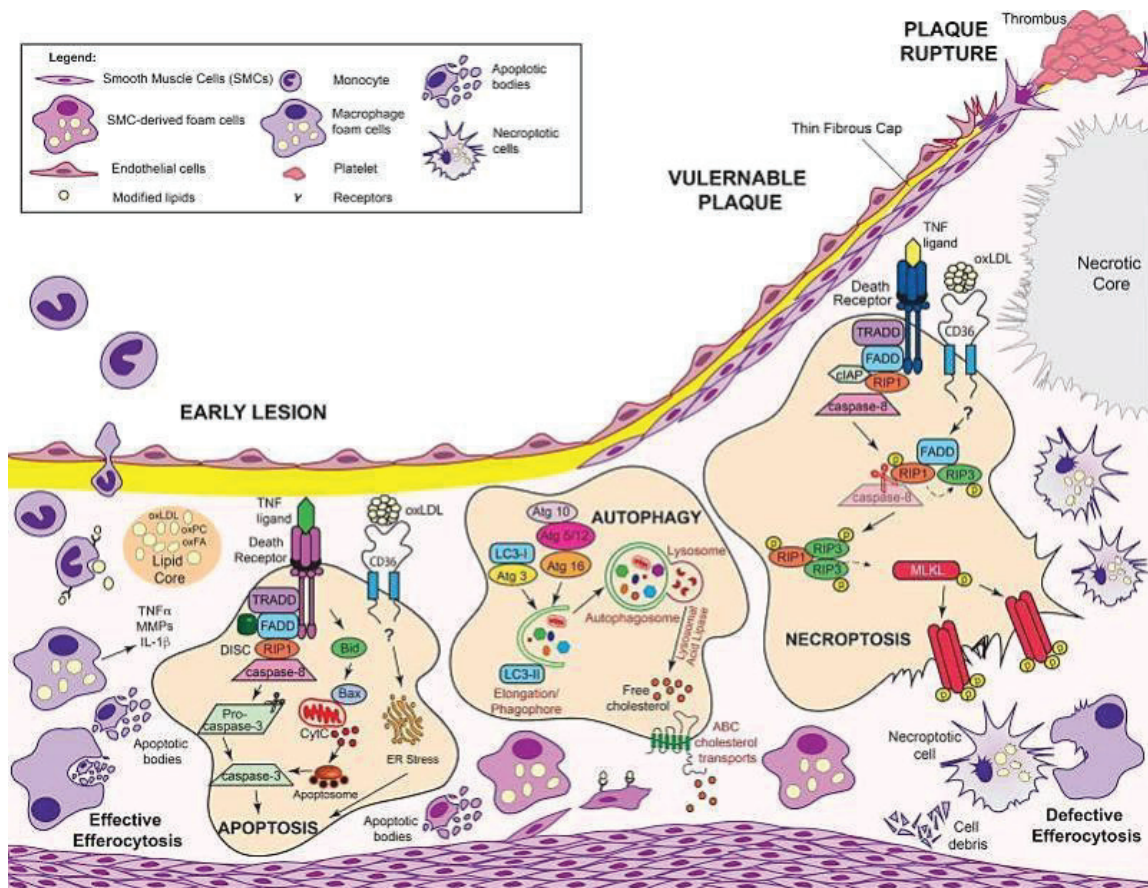


Figure 14 : Mort des macrophages et vulnérabilité de la plaque. (Adapté de ¹³⁷).

RIP1 est une sérine/thréonine kinase qui exerce un contrôle stratégique sur le destin de la cellule grâce à une ubiquitylation et une dé-ubiquitylation étroitement régulées, entraînant l'activation des voies inflammatoires et de survie cellulaire via NF- κ B, des voies apoptotiques dépendante des caspases (non-inflammatoires) et de la nécroptose induite par RIP3-MLKL (inflammatoire)^{131,138}.

Ainsi, la phosphorylation de MLKL (pMLKL) ou de son complexe sont des indicateurs de l'activation de la nécroptose. La majorité des études caractérisant les voies nécroptotiques dans les maladies se sont appuyées sur l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de la pan-caspase (le zVAD) en association avec un ligand d'intérêt (par exemple, le TNF) pour bloquer l'apoptose et ainsi favoriser l'activation de la nécroptose^{139,140}. Bien que ces études aient permis de mieux comprendre les acteurs de ces voies de mort cellulaire, la décision d'une cellule de subir une nécroptose ou une apoptose est étroitement coordonnée par un groupe de molécules régulatrices partagées entre les deux processus, en particulier la caspase-8.

L'implication de la nécroptose dans l'athérosclérose a été mis en évidence par certaines études, qui ont montré que l'inhibition de l'activité de RIP1 ou la suppression génétique de RIP3 dans des modèles de souris athérosclérotiques, réduit fortement à la fois le noyau nécrotique et la surface totale de la plaque dans le sinus aortique^{134,141}.

De plus, le groupe de K.J. Rayner a également identifié la nécroptose comme un processus actif dans l'athérosclérose humaine, où la protéine MLKL phosphorylée a été détectée dans les stades tardifs des plaques athéroscléreuses coronariennes, mais pas dans les stades précoces. Ils ont également montré que l'inhibition de MLKL par des oligonucléotides anti-sens chez des souris ApoE^{-/-} réduit la taille du noyau nécrotique dans les plaques athéroscléreuses¹⁴².

c) Pyroptose

La pyroptose est une forme de mort cellulaire programmée nouvellement découverte, associée à une activation de l'inflammasome et qui nécessite l'activité de la caspase-1¹⁴³. La mort cellulaire pyroptotique est hautement pro-inflammatoire car elle conduit à la libération de l'ensemble du contenu intracellulaire vers le liquide extracellulaire, avec en particulier la libération des cytokines IL-1 β et IL-18¹⁴⁴. La caspase-1 est responsable de la maturation et la libération de l'IL-1 β . Dans ce contexte, Li Y et al ont montré que l'inhibition de la caspase-1 par un inhibiteur spécifique (VX-765) chez des souris ApoE^{-/-} réduit la pyroptose des CML durant l'athérosclérose¹⁴⁵. Des preuves cliniques récentes montrent que les patients atteints d'une maladie cardiovasculaire peuvent bénéficier d'un traitement ciblant l'IL-1 β (Canakinumab)^{146,84}. Le ciblage de l'activité caspase-1 pour inhiber la pyroptose peut éventuellement être une stratégie de traitement pour les maladies athéroscléreuses.

3.3.5. Résolution de l'inflammation dans l'athérosclérose

Si la source pro-inflammatoire est réduite, la résolution de l'inflammation dans la plaque athéroscléreuse peut-elle s'ensuivre ?

L'IL-1 β peut être produite par des macrophages activés, des neutrophiles et des cellules endothéliales. L'IL-1 β a fait l'objet de nombreuses études ; son expression est élevée dans les lésions athéroscléreuses par rapport aux tissus non affectés, et elle est considérée comme une cible thérapeutique prometteuse pour ralentir l'athérosclérose¹⁴⁷. Néanmoins, une étude récente a montré que l'IL-1 β a un rôle plus complexe dans le processus athérosclérotique que précédemment décrit, en tout cas dans le modèle des souris ApoE^{-/-}, l'effet de IL-1 β pouvant en fait dépendre du stade de la maladie¹⁴⁸. Cette étude a révélé que l'IL-1 β au stade de développement avancé de la plaque pouvait favoriser des changements athéroprotecteurs via un remodelage et un maintien des CML dans la coiffe fibreuse¹⁴⁸. Plus important encore, ces études démontrent que dans une plaque athéroscléreuse avancée déjà inflammatoire, une amélioration de l'équilibre des processus pro-inflammatoires et anti-inflammatoires permet la résolution de l'inflammation (Fig.15). Ce concept est susceptible d'être pertinent pour les humains, car des réductions des taux plasmatiques de LDL conduisent à la régression des lésions athéroscléreuses avancées, la régression de la plaque s'accompagne de taux plus faibles d'événements de maladie cardiovasculaire athéroscléreuse¹⁴⁹.

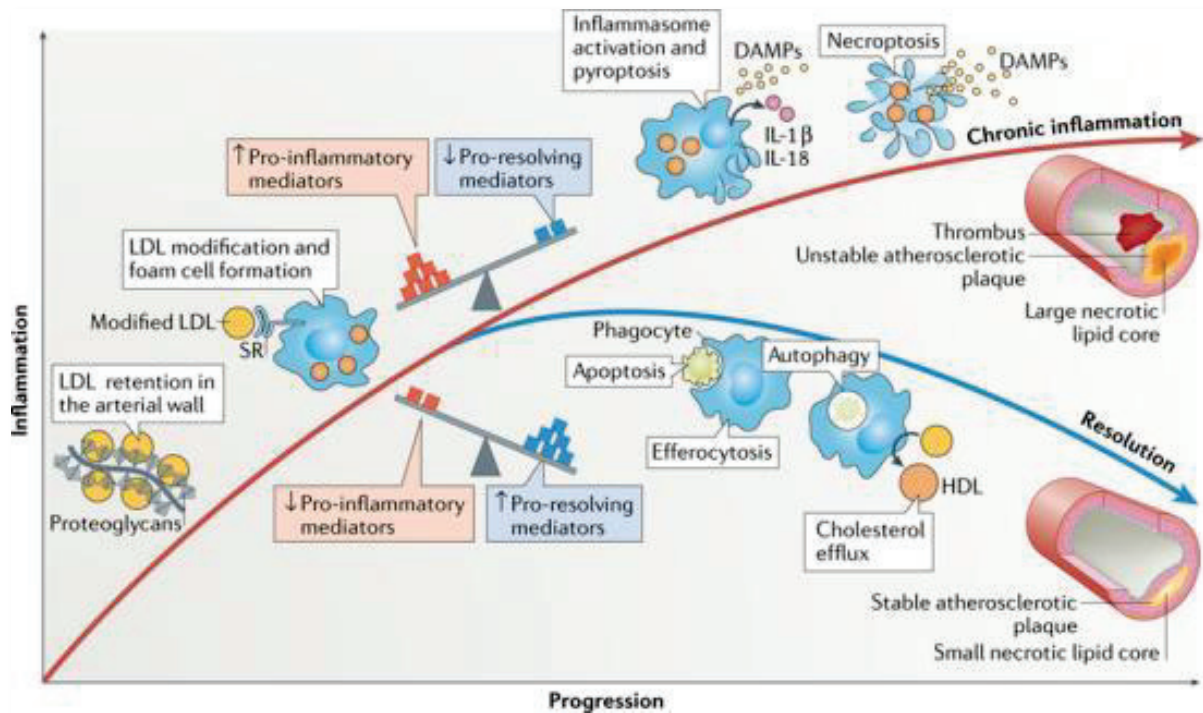


Figure 15 : L'équilibre entre les processus pro-inflammatoires et anti-inflammatoires contrôle la résolution de l'inflammation lipidique dans les lésions athéroscléroseuses. (Adapté de ¹⁰⁷).

3.4. CML : Progression de la plaque athéroscléreuse

3.4.1. Modulations phénotypiques dans la plaque athéroscléreuse

Les changements environnementaux conduisent les CML à acquérir des propriétés fonctionnelles et phénotypiques qui répondent à ces impacts sur la paroi artérielle. Ce processus est connu sous le nom de modulation phénotypique. Dans les plaques athéroscléroseuses les CML semblent avoir un haut niveau de plasticité, et présentent une forte capacité à changer de phénotype^{150,151}, en peuvent acquérir en particulier les phénotypes de type ostéochondrogénique, synthétique, spumeux, macrophage-like (Fig.16).

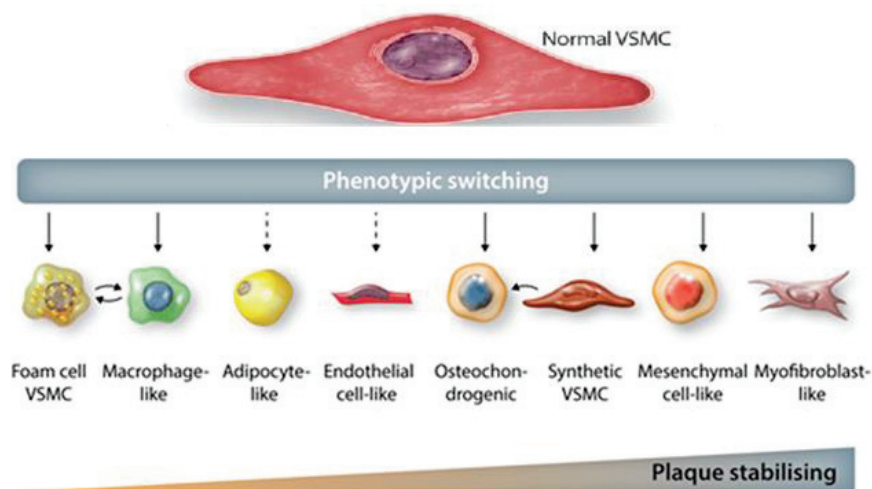


Figure 16 : Vue d'ensemble de la modulation phénotypique des CML dans la paroi artérielle. (Adapté de ¹⁵²).

Dans l'athérosclérose, les CML médiales perdent les marqueurs contractiles probablement en réponse à des lipides ou à des mitogènes libérés après une lésion¹⁵³, le changement phénotypique des CML pouvant se produire avant la migration et la prolifération^{154,155}. Les CML peuvent alterner entre différents phénotypes en réponse à divers indices environnementaux dans l'intima et la média, avec différents effets sur l'athérogenèse et la stabilité de la plaque^{156,154}. Fait important, le changement phénotypique semble être un processus, au moins partiellement, réversible et donc thérapeutiquement modifiable¹⁵⁷.

a) Différenciation ostéochondrocytaire

Le changement phénotypique des CML vers des cellules ostéochondrocytaires joue un rôle important dans la pathogenèse de la calcification vasculaire. Des études de traçage de la lignée cellulaire chez la souris montrent que 98 % de toutes les cellules ostéochondrocytaires présentes dans les plaques dérivent des CML¹⁵⁸. Les CML ostéochondrocytaires expriment plus fortement les marqueurs ostéochondrocytaires (par exemple Runx2, Sox9, ostéopontine), présentent une matrice sujette à la calcification (présence de collagène de type II) et sécrètent des vésicules calcifiantes¹⁵⁹. Runx2 est un facteur de transcription qui joue un rôle essentiel dans la différenciation des ostéoblastes et la maturation hypertrophique des chondrocytes¹⁶⁰. Son importance dans le processus de calcification vasculaire a été validé tout d'abord par Sun et al, qui ont montré que dans le modèle des souris ApoE^{-/-} la suppression du Runx2 dans les CML inhibe la calcification dans la racine aortique¹⁶¹. Les travaux de Lin et al ont ensuite montré que dans le modèle des souris Ldlr^{-/-} la suppression du Runx2 dans les CML ne bloque pas la trans-différenciation des CML vers les chondrocytes précoces, mais inhibe considérablement leur maturation ainsi que la calcification,¹⁶².

b) Acquisition d'un phénotype synthétique

Le passage du phénotype contractile au phénotype synthétique est défini par la perte de marqueurs contractiles (par exemple α -SMA, SM-22 α , calponine) avec le gain d'organites synthétiques, et de propriétés migratoires et prolifératives. Cette transformation joue un rôle essentiel dans l'athérogenèse¹⁶³. Les CML synthétiques sécrètent une grande variété de molécules pro-inflammatoires et d'enzymes (MMP) dégradant la matrice qui peuvent causer la mort des cellules voisines^{163,164}. Par conséquent, selon l'environnement local et le stade de la maladie elles peuvent soit favoriser la formation de la chape fibreuse (en exerçant des effets bénéfiques), soit favoriser l'inflammation, la calcification, la sénescence cellulaire et l'instabilité de la plaque¹⁶⁵. Historiquement, ce changement phénotypique était considéré comme la marque de la réparation vasculaire, un processus réversible dans lequel les CML reviennent à leur état contractile après avoir terminé la réparation¹⁶⁶, comme par exemple lorsque les CML néointimales acquièrent à nouveau leurs marqueurs contractiles après une blessure¹⁶⁷. Les CML conservent leur statut non contractile pendant l'athérosclérose en raison de l'exposition continue aux stimuli phénotypiques induisant un changement, bien qu'elles conservent la capacité à revenir à leur phénotype contractile¹⁵⁷.

c) Acquisition d'un phénotype spumeux

Historiquement, les cellules spumeuses étaient considérées comme dérivant uniquement des macrophages de la moelle osseuse dans les dépôts graisseux des parois des artères, où elles ingéraient des LDL, leur donnant cet aspect. Même si les macrophages contribuent à la formation de cellules spumeuses dans les plaques athéroscléreuses, les CML aussi se transforment en cellules spumeuses lorsqu'elles sont exposées à des LDL agrégées ou oxydées dans l'intima et la média des souris et des humains hyperlipidémiques¹⁶⁸. En fait, la majorité des cellules spumeuses des plaques athéroscléreuses semblent même dériver des CML¹⁶⁸. Le captage de lipides se produit traditionnellement par l'intermédiaire de récepteurs phagocytaires spécialisés (par exemple SR-A et CD36), mais peut également impliquer d'autres voies, telles que la phagocytose et l'autophagie¹⁶⁹. Les CML en culture chargées en lipides sécrètent une variété de médiateurs pro-inflammatoires¹⁷⁰ et subissent l'apoptose en raison d'une surcharge en cholestérol libre,¹⁷¹ ce qui peut jouer un rôle in vivo dans la compromission de la stabilité de la plaque. L'excès de cholestérol dans les CML est probablement le résultat d'un efflux de cholestérol inadéquat dû à une expression réduite du transporteur ABCA1 ou une autophagie altérée dans les plaques avancées¹⁶⁸.

d) Acquisition d'un phénotype macrophagique

Des CML de type macrophagique se forment à la fois dans les plaques athéroscléreuses humaines^{168,172} et murines^{153,169}. Le passage à une cellule de type macrophagique est probablement dû à l'accumulation de lipides, car la charge de cholestérol provoque la trans-différenciation des CML en culture en macrophages¹⁷³. Les CML de type macrophagique sont caractérisées par une augmentation des marqueurs de macrophages, tels que CD68 et des cytokines pro-inflammatoires¹⁷². Par conséquent, la question se pose de savoir si les CML de

type macrophagique sont aussi nocives pour la stabilité de la plaque que leurs homologues myéloïdes. En effet, les CML de type macrophagique sont transcriptionnellement et fonctionnellement différentes des macrophages d'origine myéloïde¹⁵³. Dans l'ensemble, la présence de marqueurs macrophages dans les CML n'impliquent pas une fonctionnalité complète en tant que macrophages ni une spécificité cellulaire, ce qui rend difficile la prédiction de leur impact sur la croissance et la stabilité de la plaque athéroscléreuse.

3.4.2. Implications de la plasticité des CML dans la plaque athéroscléreuse

En adoptant différents phénotypes, il est clair que les CML pourraient avoir des rôles bénéfiques ou néfastes dans l'athérosclérose ainsi que sur la stabilité ou la rupture de la plaque¹⁵². Les CML phénotypiquement modifiées peuvent également sécréter une large gamme de cytokines qui peuvent influencer les cellules voisines de manière paracrine, bien que les CML puissent revenir à leur phénotype contractile sous certaines conditions^{167,157}. Le contenu final des CML dans la lésion est déterminé par l'équilibre entre la migration des CML, la prolifération, la mort et la sénescence. Il était, jusqu'à récemment, admis que les CML aux stades ultérieurs de l'athérosclérose ont un effet entièrement bénéfique, en stabilisant la plaque à travers la génération de la chape fibreuse. Cependant, de nombreuses études de lignage ont définitivement montré une plasticité des CML et ont suggéré que ces cellules peuvent moduler leur comportement en réponse à une variété de stimuli¹⁵² (Fig.17).

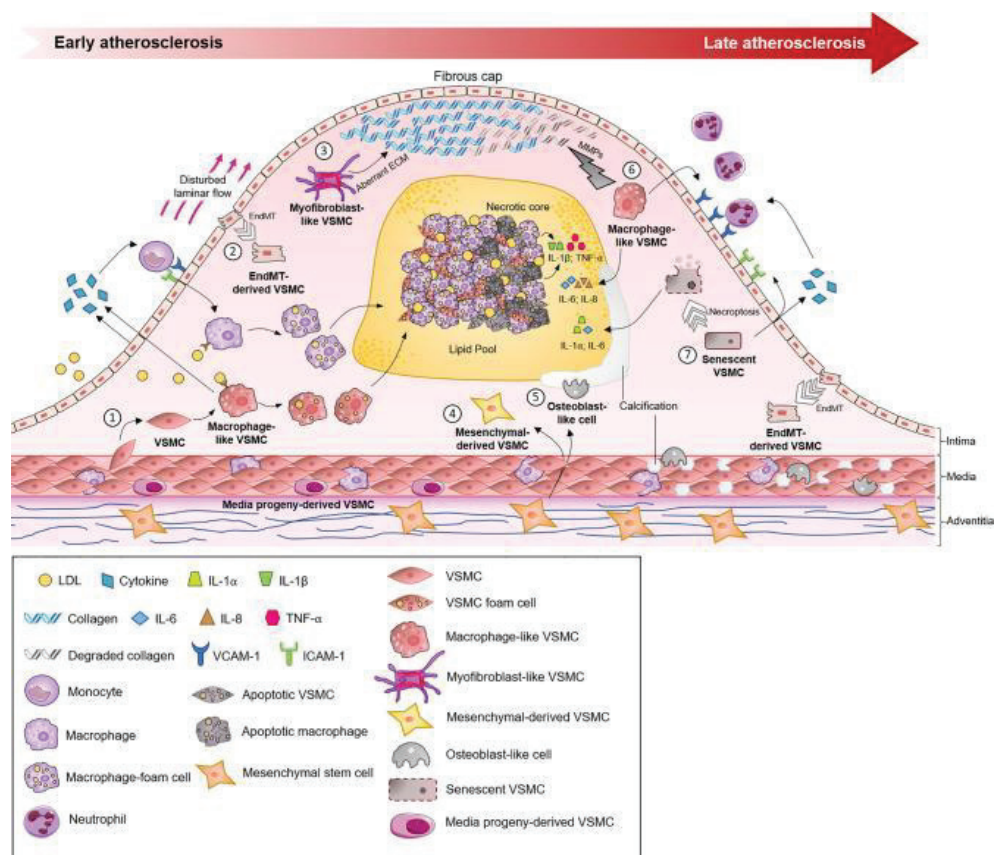


Figure 17 : Représentation schématique de plusieurs processus médiés par les CML dans la plaque athéroscléreuse. (Adapté de ¹⁷⁴).

Les CML représentent de 30 à 70 % des cellules exprimant des marqueurs macrophagiques^{172,169} et à un pourcentage similaire de cellules spumeuses dans les plaques athéroscléreuses de souris et à environ 30 à 40 % des cellules CD68+ et 50 % de cellules spumeuses dans les plaques athéroscléreuses humaines^{172,168}. Enfin, comme discuté par Baylis et al il est nécessaire de mettre en œuvre des modèles murins précliniques de régression ou de traitement de la plaque établie qui imitent l'intervention thérapeutique chez l'homme pour étudier d'une façon plus claire les fonctions des CML¹⁷⁵.

3.4.3. Balance entre migration, prolifération et sénescence dans la plaque athéroscléreuse

a) Migration et prolifération

En général, les CML ont été décrites pour, tout d'abord, migrer de la média vers l'intima puis proliférer et former la coiffe fibreuse¹⁶³, la migration des CML médiales pouvant néanmoins être précédée de prolifération^{169,176}. Les CML dans les plaques athéroscléreuses avancées présentent de faibles indices prolifératifs¹⁷⁷. Les CML peuvent migrer et contribuer à la formation de lésions¹⁷⁸. Plusieurs études ont suggéré que la migration des CML se produit indépendamment de la prolifération et qu'elle n'est pas un facteur majeur de la formation des lésions^{150,169,179}.

b) Sénescence

La sénescence cellulaire est définie comme un état d'arrêt de croissance irréversible et catégorisé comme sénescence répllicative, en raison de l'épuisement réplcatif de durée de vie cellulaire, ou sénescence prématurée stimulée par de nombreux stimuli externes, tels que DAMP ou le stress oxydant¹⁸⁰. Les deux types de sénescence activent une réponse aux dommages à l'ADN pour développer le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) qui crée un environnement riche en cytokines pro-inflammatoire (par exemple IL-6, IL-8)¹⁸⁰, des chimiokines (par exemple MCP1), des protéases (par exemple MMP)¹⁸¹ (Fig.18). Les CML des plaques humaines montrent une prolifération réduite, une sénescence précoce et une régulation à la hausse des marqueurs d'arrêt du cycle cellulaire, y compris P21 et P16¹⁸². De plus, les CML intimaux des plaques humaines ont des télomères beaucoup plus courts que les CML médiales, indiquant que la longueur des télomères est inversement corrélée à la gravité de l'athérosclérose¹⁸². La sénescence cellulaire a été reconnue comme une caractéristique importante du vieillissement, en plus de ses conséquences fonctionnelles sur les CML dans les plaques athéroscléreuses¹⁸³.

De plus en plus de preuves suggèrent que la sénescence des CML contribue à la progression et à la déstabilisation des plaques athéroscléreuses. En raison de la perte de potentiel prolifératif des cellules sénescents, la sénescence peut déclencher directement l'instabilité de la plaque en réduisant la teneur de la chape fibreuse. Cependant, des données récentes suggèrent un rôle plus actif de la sénescence des CML qui favorise la déstabilisation de la

plaque en provoquant l'inflammation de la plaque et la dégradation de la matrice^{184,185}. Comme par exemple, l'étude *in-vitro* publiée en 2017 qui a montré la capacité des CML humains sénescents à libérer le marqueur pro-inflammatoire (IL-1 β) dans le milieu de culture¹⁸⁶.

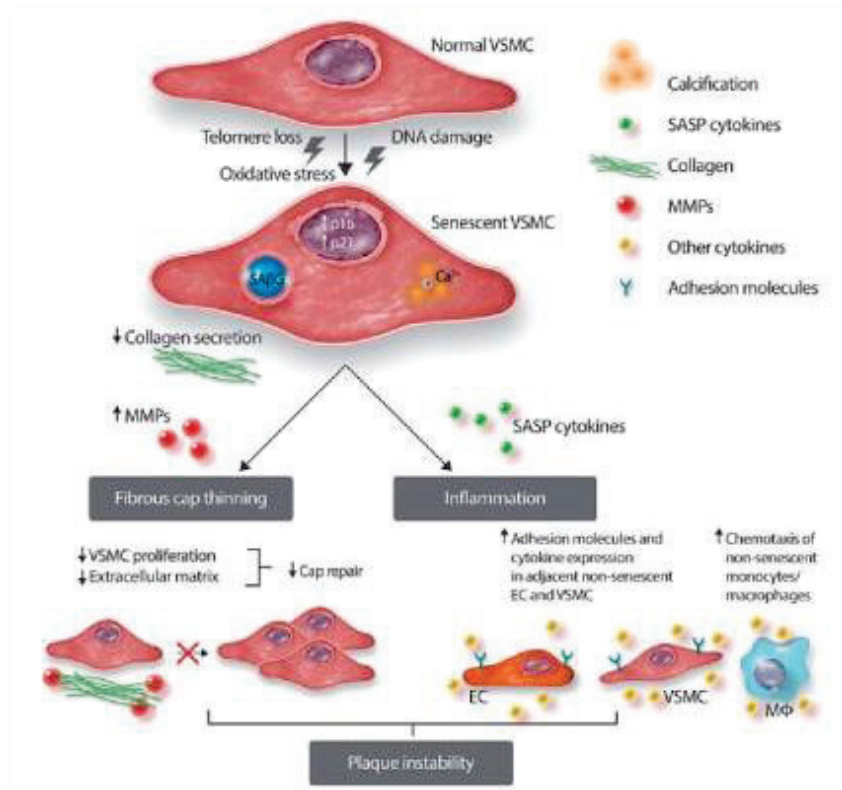


Figure 18 : Sénescence des CML dans l'athérosclérose et instabilité de la plaque.
(Adapté de ¹⁸⁷).

3.4.4. Formes de mort dans la plaque athéroscléreuse

Différentes formes de mort des CML se produisent potentiellement dans la plaque athéroscléreuse, y compris l'apoptose, la nécrose, la nécroptose et la pyroptose^{188,164,156} bien que le rôle de ces deux dernières formes de mort cellulaire programmée, nouvellement reconnues, dans l'athérosclérose n'a pas été clairement élucidé.

a) Apoptose

Les indices apoptotiques sont faibles dans les plaques précoces, mais augmentent à mesure que les lésions deviennent plus avancées¹⁸⁹, et sont plus élevés dans les plaques symptomatiques par rapport aux lésions stables¹⁹⁰. Les débris apoptotiques s'accumulent en particulier dans la région centrale, mais les marqueurs d'apoptose sont transitoires, de sorte que ces indices ne mesurent pas uniquement les taux d'apoptose ou l'efficacité des clairances des cellules apoptotiques, mais peut aussi marquer les cellules nécrotiques¹⁹¹. Compte tenu de ces limites, les effets et l'incidence de l'apoptose des différents phénotypes des CML sont pour la plupart inconnus.

b) Nécrose

La nécrose a longtemps été considérée comme une forme accidentelle et incontrôlée de la mort cellulaire. Cependant, des études récentes démontrent que la nécrose est un mécanisme de mort cellulaire régulé, en particulier par RIP1 et 3 comme évoqué précédemment¹⁸⁷. La nécrose de l'athérosclérose est déclenchée par divers stimuli tels que les niveaux de ROS, de LDL hautement oxydées, ou de calcium intracellulaire¹⁹². L'efferocytose inefficace des CML apoptotiques conduit également à une nécrose secondaire et une inflammation induite par IL-1 β ¹⁹³. La nécrose des cellules de la plaque contribue à la vulnérabilité de cette dernière en libérant des médiateurs pro-inflammatoires et des MMP, tandis que l'inhibition de la nécrose améliore la stabilité de la plaque chez la souris¹⁹².

Chapitre 2. Calcifications vasculaires

I. Physiopathologie vasculaire : calcifications

1. Score calcique et mortalité

L'étude systématique des facteurs de risque d'athérosclérose est apparue du regroupement de résultats expérimentaux, d'études transversales et enfin d'études longitudinales chez l'homme. L'étude prospective menée dans la ville de Framingham, la « *Framingham heart study* », a fourni un support rigoureux à l'idée selon laquelle l'ensemble des facteurs de risques de Framingham tels que l'âge, le sexe, le tabac, le cholestérol total, le HDL-cholestérol, la pression artérielle ou encore le diabète sont les responsables pour prédire les événements cardiovasculaires sur une période bien déterminée¹⁹⁴.

Le calcium de l'artère coronaire ou score calcique (CAC) est une caractéristique très spécifique de l'athérosclérose^{195,196}. Il est une mesure de l'étendue des dépôts athéromateux calcifiés observés au niveau des parois des coronaires. Le CAC améliore la prédiction du risque cardiovasculaire lorsqu'il est ajouté au facteur de risque de Framingham¹⁹⁷. Il permet de révéler un risque accru de mortalité cardiovasculaire chez les patients asymptomatiques¹⁹⁸, en particulier ceux avec un score de risque de Framingham intermédiaire de 5 à 20 %¹⁹⁹ (Fig.19). En 1990 Arthur Agatston et Warren Janowitz ont développé cette notion de calcification des artères coronaires. La détection de ces calcifications a été réalisée grâce à des méthodes non-invasives utilisant des applications du scanner qui permettent une acquisition rapide des images [tomographie par faisceau d'électrons (EBCT, scanner ultrarapide) et scanner multi coupes (MDCT)]. La présence de calcifications coronaires est quantifiée de façon semi-automatique par un logiciel développé par Agatston et al qui prend en compte chaque lésion > 1mm² avec une densité Housfield > 130 UH. Le CAC est issu de la multiplication de la surface de la ou des calcifications par la densité de la plaque. Bien que d'autres méthodes de quantification existent, le score d'Agatston reste le plus utilisé en raison de sa simplicité.

Des catégories standardisées ont été développées avec des scores permettant de faciliter l'interprétation²⁰⁰ (Fig.19) :

- 1- CAC = 0 : pas de plaque calcifiée
- 2- CAC 1 à 10 : peu de plaque calcifiée
- 3- CAC 10 à 100 : calcification légère
- 4- CAC 100 à 400 : calcification modérée
- 5- CAC > 400 : calcification importante

Un CAC élevé est un marqueur de mauvais pronostic, alors qu'un CAC à zéro est un marqueur de très bon pronostic²⁰¹. La progression du CAC ajoute une valeur prédictive supplémentaire et est étroitement corrélée à l'avancement du risque cardiovasculaire²⁰².

Les avantages du CAC détecté par scanner comprennent la facilité d'interprétation, une reproductibilité élevée, un coût faible et l'absence de la nécessité d'une injection intraveineuse. D'autre part, parmi les inconvénients il faut souligner l'incapacité de fournir des informations sur la morphologie en raison de sa faible résolution, et de distinguer entre les différentes formes de calcification « microcalcifications » et « macrocalcifications »^{203,204}.

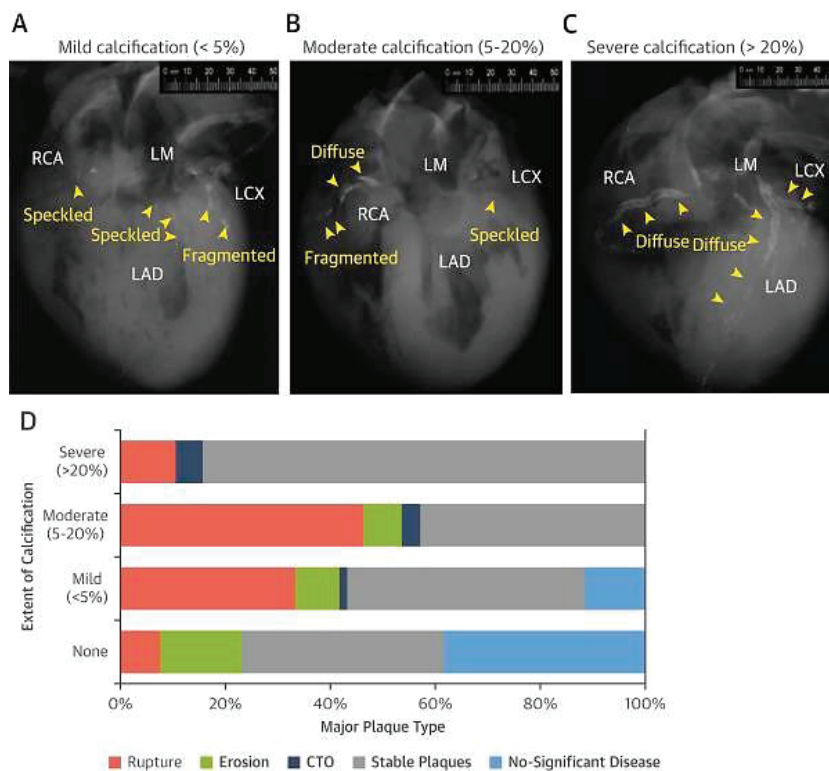


Figure 19 : Degré de calcification par type de plaque. (A à C) images représentatives montrant différents degrés dans l'extension du CAC et différents types de calcifications dans l'évaluation visuelle du cœur entier par radiographie. **(D)** distribution des principaux types de plaques par patient. CAC = calcification de l'artère coronaire ; CTO = occlusion total chronique, LAD = artère descendante antérieure gauche ; LCX = artère circonflexe gauche ; LM = tronc principal gauche ; RCA = artère coronaire droite. (Adapté de ²⁰⁵).

2. Hétérogénéité des calcifications dans la plaque athéroscléreuse

La présence de calcification ne diffère pas entre les artères symptomatiques et asymptomatiques²⁰⁶. Les plaques calcifiées provoquant une sténose peuvent être plus stables que les plaques non-calcifiées²⁰⁷. À l'inverse des lésions sténotiques sévères (> 70 %) ont été rapportées comme étant liées à des calcifications sévères situées sur la couche externe de la plaque athérosclérotique²⁰⁸. De nombreuses études visent à expliquer le rôle des calcifications

dans les plaques athéroscléreuses en précisant les différents critères qui peuvent intervenir dans la progression et la stabilité des plaques. Le nombre de calcifications, la taille, la morphologie et la localisation dans les plaques sont les déterminants de la vulnérabilité ou bien de la stabilité au cours de l'athérosclérose.

2.1. Hétérogénéité selon la localisation de la plaque dans les artères

Pour mieux comprendre le processus des calcifications vasculaires il faut tout d'abord mettre en lumière le lien entre la composition des plaques et son emplacement dans les vaisseaux. La biocollection ECLAGEN a montré que le développement et la composition des plaques dépendent de leur emplacement anatomique dans les artères^{23,209} (Fig.20). Les artères abdominales et carotidiennes développent des lésions riches en lipides, avec une présence marquée de noyau lipidique (75 % et 56 %). Les artères fémorales et infrapoplitées présentent des lésions hautement fibreuses et/ou calcifiées. Les plaques des artères infrapoplitées sont largement fibreuses (57 %) mais développent également une grande calcification (33 %). Les artères fémorales présentent principalement des lésions calcifiées (56 %) et des lésions fibreuses (16 %). Cette hétérogénéité des plaques, dépendante de leur emplacement, est corrélée avec les différences de charge en calcium qui, en terme général, englobe diverses formes de structures minéralisées²⁰⁹ (Fig.20).

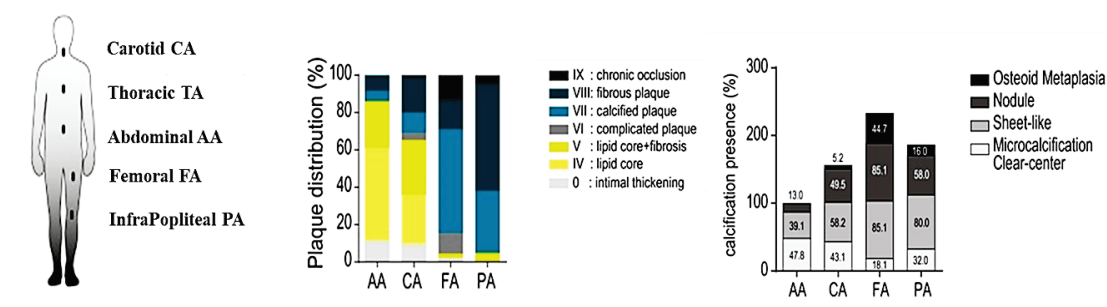


Figure 20 : Lésions athéroscléreuses hétérogènes dans différents artères. Classification AHA de la composition des plaques selon leur emplacement dans les artères. Différents types de calcifications présentes dans différentes artères incluses de la biocollection ECLAGEN. (Adapté de ^{23,209}).

2.2. Progression selon le type de la plaque dans les artères

La calcification progresse avec le type de plaque ainsi qu'avec le degré de rétrécissement de la lumière²¹⁰ (Fig.21). Le type et la complexité de la plaque augmentent avec des degrés de rétrécissement de la lumière qui sont plus élevés, tout comme la zone de calcification²¹¹. Cependant, le modèle et l'étendue de la calcification ne sont pas en corrélation linéaire avec la taille du noyau nécrotique et ont tendance à différer fortement selon le type de plaques.

Dans le fibroathérome, le TCFA et la rupture, la zone nécrotique centrale augmentent progressivement, mais la calcification peut ou non augmenter proportionnellement. Dans les ruptures cicatrisées et les plaques fibrocalciques, la zone de calcification augmente de manière disproportionnée par rapport à la zone nécrotique centrale à mesure que le vaisseau se rétrécit. La sévérité de la sténose luminale est corrélée à la charge des calcifications^{211,210}. La surface moyenne de calcification diverge suivant les types de plaques²⁰⁵. La plaque fibrocalcique a tendance à avoir la plus grande quantité de calcification. La calcification artérielle est en corrélation avec la charge de la plaque, alors qu'il n'y a pas de corrélation entre la calcification et la surface de la lumière²¹². La charge de calcium est plus élevée dans les plaques stables par rapport aux plaques instables et il existe une relation inverse entre la zone centrale nécrotique et la charge de calcification²⁰⁵ (Fig.21).

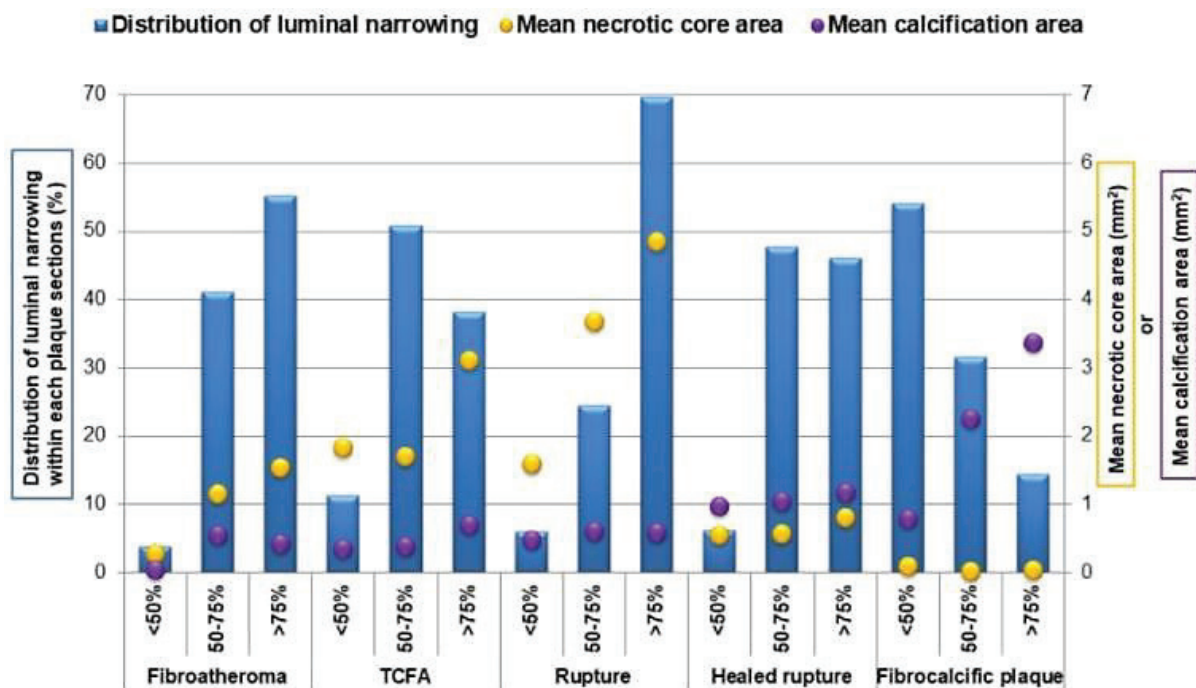


Figure 21 : Graphique montrant le pourcentage de rétrécissement de la zone de la lumière (barres bleues). Divisé en rétrécissement sévère (> 75 %), modéré (50 % à 75 %) et léger (< 50 %), par type de plaque. Le noyau nécrotique moyen (cercles jaunes) et la zone de calcification (cercles violets) sont également indiqués pour chaque pourcentage de rétrécissement. (Adapté de ²⁰⁵).

2.3. Morphologie dans les plaques humaines des artères coronaires

Les calcifications sont classées selon leur taille et leur morphologie²¹³. Les microcalcifications et la forme initiale de calcification sont observées dans les lésions avec un épaissement intimal pathologique (PIT) et sont définies comme des particules de calcium variant en diamètre entre > 0,5 μm – 15 μm < dans des coupes histologiques transversales²¹⁰. La

calcification ponctuelle se produit sous forme de dépôts de calcium $\geq 15 \mu\text{m}$ mais $< 1 \text{ mm}$, elle est fréquemment observée dans les lésions plus avancées telles que les fibroathéromes avec un noyau nécrotique précoce^{210,214}. Les macrophages apoptotiques ou bien libérant des vésicules extracellulaires pourraient contribuer également à initier la micro- et la calcification ponctuelle. La calcification fragmentée « *fragmented* » se produit lorsque les dépôts deviennent $\geq 1 \text{ mm}$ et peuvent être observés au bord des noyaux nécrotiques tardifs dans les plaques fibroathéromateuses tardives. La calcification dite en feuilles « *Sheet* » est notée lorsque les dépôts présentent des diamètres supérieurs à 3 mm , elle est considérée comme en lien avec la stabilisation de la plaque. Elle est observée dans les plaques fibrocalcifiées avec un noyau nécrotique incomplètement ou complètement calcifié. La calcification nodulaire est la moins fréquente, elle peut se produire dans la plaque en l'absence de thrombus luminal. Les composants de cette calcification sont des dépôts de calcium nodulaires et de la fibrine avec une coiffe fibreuse intacte (Fig.22). L'ossification avec formation médullaire intermédiaire est rarement observée dans l'artère coronaire mais dans les artères périphériques. Ces définitions sont adaptées non seulement aux artères coronaires mais également aux artères périphériques et peuvent décrire des formes de calcifications intimale et médiale²¹⁵.

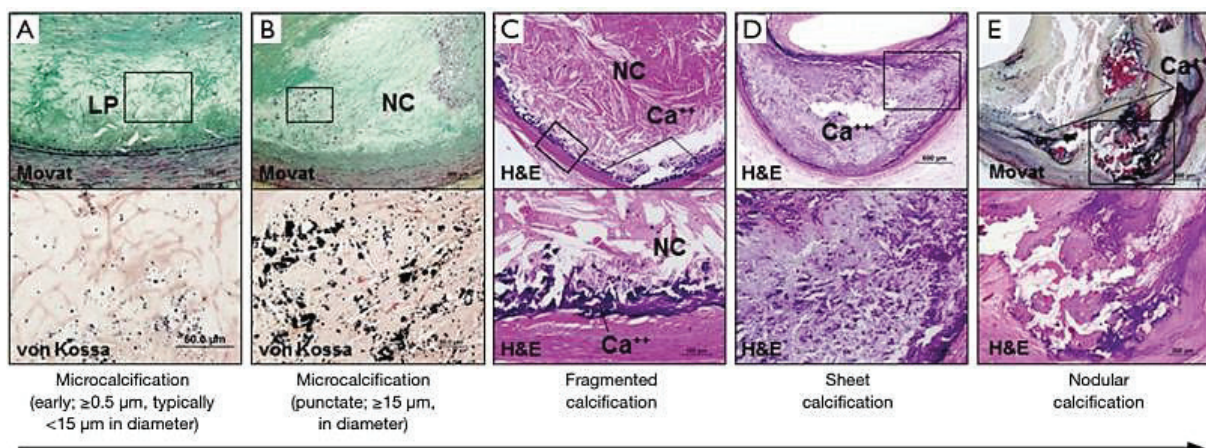


Figure 22 : Coupes histologiques représentatives montrant la progression des calcifications dans les plaques coronaires humaines. (A) épaissement intimal pathologique (PIT) caractérisé par un noyau lipidique (LP) montrant une microcalcification précoce détectée par la coloration von Kossa dans le LP (correspondant à la zone encadrée dans l'image avec coloration Movat). **(B)** noyau nécrotique précoce (NC) montrant des zones de calcification ponctuelles relativement plus grandes détectées par la coloration von Kossa dans le NC. **(C)** le degré de calcification augmente généralement vers la paroi médiale où des calcifications fragmentées « *fragmented* » peuvent être vues. **(D)** la calcification progresse généralement dans la zone environnante du NC, ce qui conduit au développement de feuilles de calcification « *sheet* ». **(E)** calcification nodulaire caractérisée par des ruptures dans des plaques calcifiées avec des fragments de calcium séparés par la fibrine. (Adapté de ²¹⁰).

2.4. Morphologie dans les plaques humaines des artères périphériques

Les plaques athérosclérotiques périphériques ont été classées en utilisant la classification modifiée de l'AHA proposée pour les lésions athérosclérotiques coronariennes (Fig.23). Les lésions athérosclérotiques sont plus fréquemment détectées dans les artères au-dessus du genou (92,9 %) que dans les artères en dessous du genou (56,9 %). La prévalence des nodules calcifiés est plus élevée dans les artères au-dessus du genou que dans les artères coronaires (2 à 7 %) ²¹⁶ et les artères carotides (4 à 14 %) ²¹⁷. Des calcifications intimaux et médiales sont fréquemment observées (75,5 % et 86,2 %, respectivement). La progression de la calcification intimaux est associée à la présence d'une sténose dans les artères au-dessus du genou, alors qu'il n'y a pas de corrélation entre la progression de la calcification médiale et la présence d'une sténose ²¹⁸. L'étude histopathologique de Narula et al a montré que l'athérosclérose est plus fréquente dans les artères fémorales et poplitées que dans les artères infrapoplitées ³³.

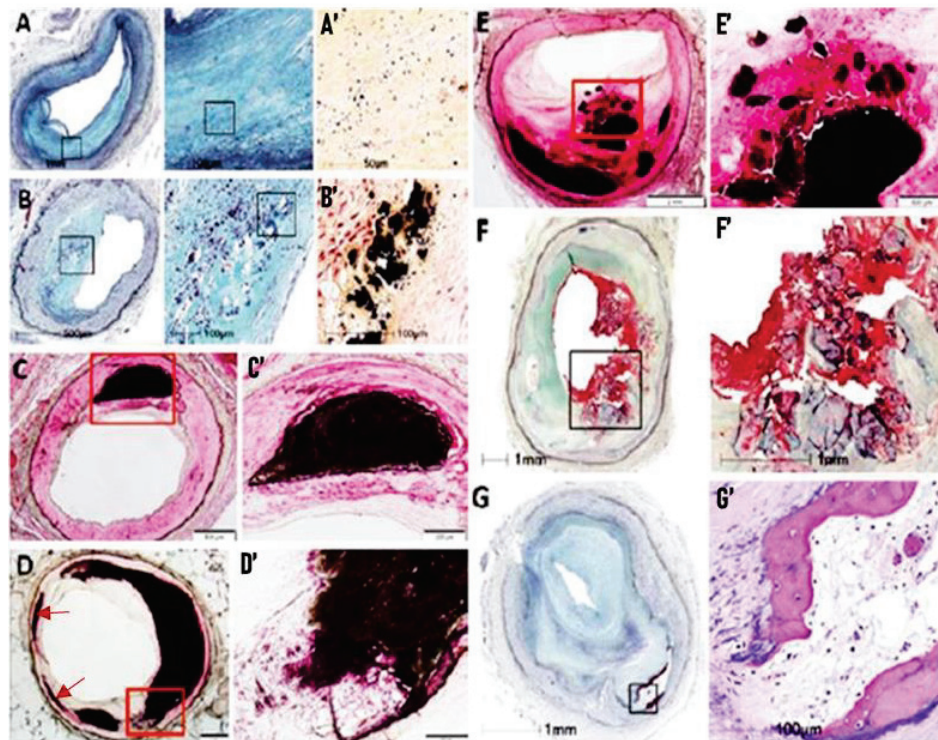


Figure 23 : Coupes histologiques représentatives montrant la progression de la calcification intimaux dans les artères périphériques des membres inférieurs. (A) coloration pentachrome Movat montrant les microcalcifications présentes dans les zones de noyau lipidique (LP) (zone encadrée), mais peu visibles en raison de leur petite taille (0,5 µm à 10 µm). **(A')** Coloration von Kossa montrant les microcalcifications (points noirs). **(B-B')** microcalcifications ponctuelles dans la zone adjacente au noyau lipidique montrée par coloration Movat et von Kossa respectivement. **(C-C')** calcification intimaux fragmentée avec des microcalcifications au centre. **(D-D')** feuille de calcification intimaux (cadre rouge) avec deux petites zones adjacentes de calcification médiale fragmentée (flèches rouges). **(E-E')** calcification nodulaire intimaux. **(F-F')** nodule calcifié avec thrombus luminal. **(G et G')** formation osseuse intimaux observée par coloration Movat et H&E respectivement. (Adapté ^{214,230}).

3. Impact de la localisation intraplaque sur la vulnérabilité

Les calcifications à différents endroits de la plaque peuvent jouer des rôles différents dans la vulnérabilité de la plaque²⁰⁸. Plusieurs études ont montré l'association entre la calcification à la surface de la plaque (proche de la lumière) et la vulnérabilité de la plaque^{219,220}. Au cours des processus physiologiques et biomécaniques complexes de l'hémorragie intraplaque (IPH) et de la rupture de la plaque, les calcifications à la surface proche de la lumière pourraient augmenter le stress local et les étirements²²¹. L'analyse structurale sur des modèles de plaques a montré que la calcification à l'intérieur d'une coiffe fibreuse mince peut entraîner des phénomènes de stress élevés et entraîner la rupture de la plaque²²². Plus la coiffe de la plaque est mince, plus les stress produits sont élevés²²¹. Néanmoins, une étude *ex-vivo* plus ancienne sur la stabilité biomécanique suggérait que la calcification n'augmente pas la contrainte de la coiffe fibreuse dans les plaques athéroscléreuses coronaires humaines rompues ou stables²²³. D'autre part, les calcifications profondes loin de la lumière peuvent avoir peu ou pas d'impact sur le stress de la plaque. De plus, il pourrait agir comme une barrière à la croissance de vasa vasorum ou à la propagation de stimuli inflammatoires réduisant ainsi la rupture de la plaque²²⁴.

4. Impact de la taille sur l'athérosclérose : macrocalcifications

Il est utile de considérer la calcification comme un processus en 2 phases séparées par la taille des calcifications : les étapes initiales précoces avec des **microcalcifications** et les étapes finales tardives avec des **macrocalcifications**. Les microcalcifications et les macrocalcifications sont deux entités différentes qui peuvent être trouvées à proximité chez les patients²²⁵.

4.1. Définition

Les macrocalcifications, sont de grosses calcifications, généralement de plus de 50 μm ²²⁶ (Fig.24). Elles sont traditionnellement associées à la stabilité de la plaque, représentant la phase finale dans le processus de réparation en réponse à une inflammation nécrotique intense⁹. Une étude biomécanique récente a cependant montré que les macrocalcifications génèrent probablement un stress mécanique qui peut affecter la stabilité de la plaque en induisant des effets indésirables²²⁷.

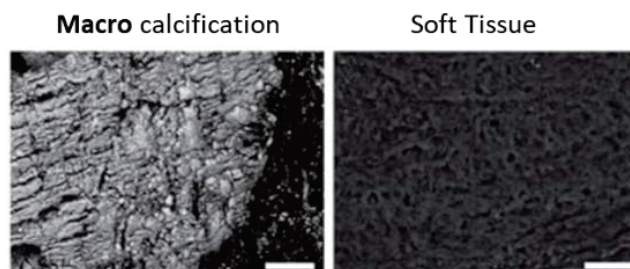


Figure 24 : Image représentative de macrocalcifications. Barre d'échelle 50 μm .
(Adapté de ²²⁸).

4.2. Classification

Les classifications radiographique et histologique des calcifications ont permis de distinguer entre les différentes formes de macrocalcifications (Fig.25). La calcification tachetée « *speckled/spotty calcification* » observée par radiographie correspond à une calcification ponctuée ou fragmentée par histologie. Le site de rupture de la plaque montre une calcification fragmentée par radiologie qui correspond à la même calcification par histologie. Ces deux formes de macrocalcifications présentes dans les stades TCFA et rupture sont probablement les responsables d'une probabilité élevée de rupture de la plaque. Les « *Healed rupture* » et « *Fibrocalcific plaque* » présentant toutes les deux une calcification diffuse par radiographie correspondent à une calcification « *Sheet* » ou « *Nodules* » par histologie. Cette forme de macrocalcification serait responsable de la stabilité de la plaque²⁰⁵.

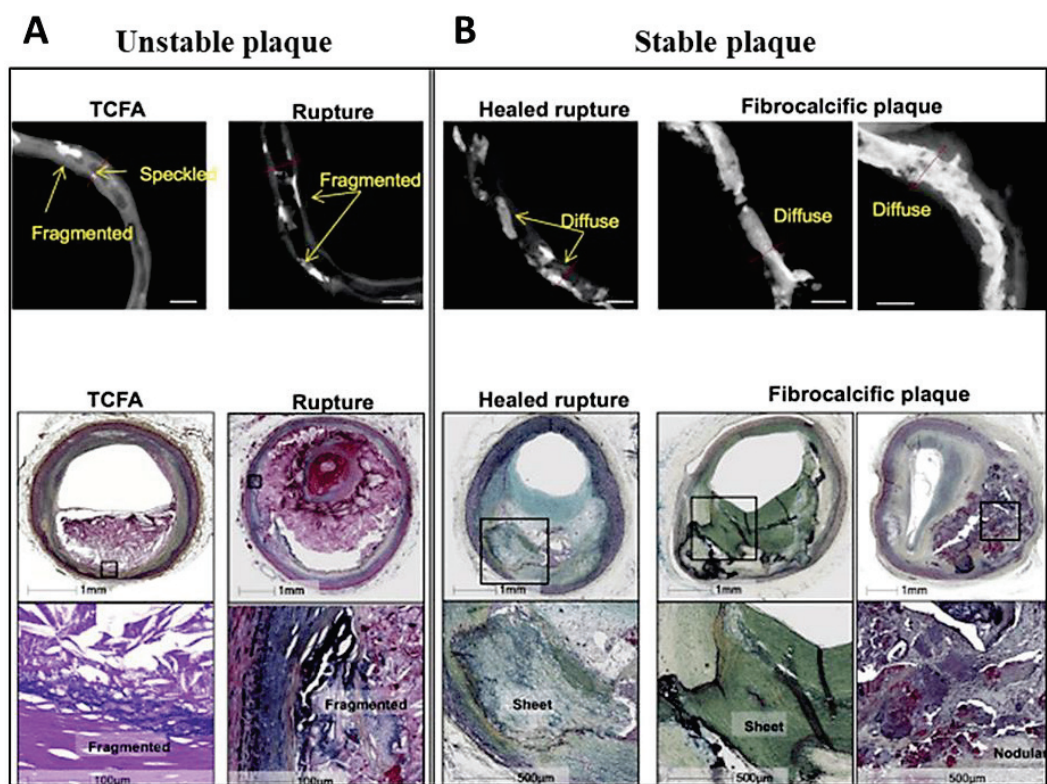


Figure 25 : (A et B) radiographie et images histologiques en coupe transversale des artères coronaires, respectivement, montrant les corrélations entre les différentes formes de macrocalcifications selon les types des plaques. La barre d'échelle (ligne blanche) sur la radiographie indique 5 mm. (Adapté de ^{213,205}).

4.3. Détection

La détection invasive de l'arc et la longueur des calcifications par OCT (*optical coherence tomography*) est utilisée pour distinguer plutôt les macrocalcifications. Les macrocalcifications ont été classées comme des dépôts de calcium avec un arc $> 90^\circ$ avec l'OCT^{229,230}. De plus, les macrocalcifications peuvent facilement être détectées par CT scan. Par contre, les images TEP au Na^{18}F ne permettent pas d'identifier les macrocalcifications en raison de leur maturation, où le cœur d'hydroxyapatite est internalisé. Comme déjà mentionné, et d'après Mizukoshi et al²²⁹, ces macrocalcifications sont inversement corrélées à la rupture de la plaque. Compte tenu des différents résultats sur les macrocalcifications, le rôle de la taille de la calcification dans la vulnérabilité de la plaque pourrait être bi phasique²³¹.

4.4. Inflammation et stabilisation

Dans la réponse de réparation des plaques athéroscléreuse, les cellules inflammatoires pourraient jouer un rôle central en favorisant le changement phénotypique des lymphocytes T et des macrophages de Th1/M1 en Th2/M2 induisant la résolution de l'inflammation et la régression/stabilisation de la plaque²³² (Fig.26).

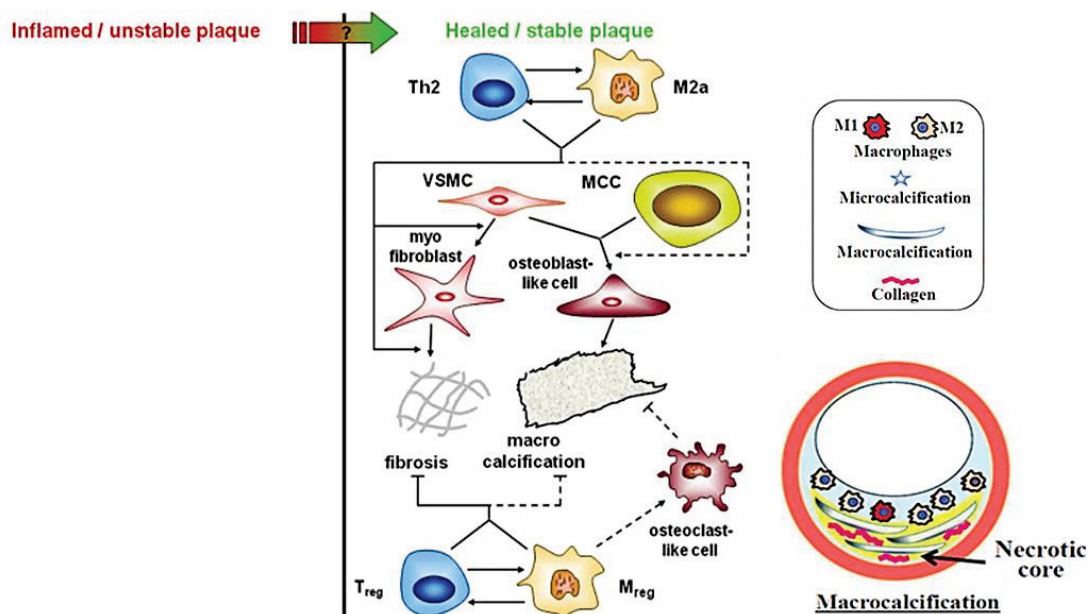


Figure 26 : Mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation du modèle de la calcification athéroscléreuse. Les CML et les macrophages participent à la formation des macrocalcifications vasculaires. Une sous-population de cellules myéloïdes calcifiantes (MCC) en circulation peut également participer à cette formation. Un déplacement phénotypique des lymphocytes T et macrophages de Th1/M1 vers Th2/M2a est essentiel pour éteindre l'inflammation et favoriser la réparation des tissus. Un nouveau virage vers T_{reg}/M_{reg} ou M2c pourrait être responsable de la limitation de la réponse fibrotique et éventuellement ostéogénique. (Adapté de ^{243,233}).

Cette réponse adaptative est caractérisée par l'induction de la fibrose à la fois directement (grâce à une synthèse accrue de collagène, de MMP et de leurs inhibiteurs tissulaires) et via l'activation des myofibroblastes²³⁴.

La fibrose est déclenchée par les lymphocytes pro-fibrotiques (Th2) et les macrophages (M2a). La fonction fondamentale des macrophages M2a dans la réparation est la phagocytose des débris cellulaires nécrotiques et des cellules apoptotiques dans les lésions. L'IL-10 est l'une des cytokines anti-inflammatoires sécrétée par les macrophages M2a qui aide à limiter l'inflammation de la plaque et la fibrose, tout en stimulant les macrophages régulateurs (M_{reg} ou M2c) et les lymphocytes régulateurs (T_{reg}). M_{reg} produit plusieurs protéines immuno-régulatrices telles que l'IL-10, MMP9 et l'arginase 1 qui inactivent les myofibroblastes et favorisent la fibrolyse tout en supprimant la réponse inflammatoire²³⁵. Dans les phases tardives, les macrophages M2c aident non seulement à produire une matrice extracellulaire, mais facilitent également la formation des microcalcifications en favorisant la différenciation ostéoblastique des CML²³² (Fig.26).

5. Impact de la taille sur l'athérosclérose : microcalcifications

5.1. Définition

Les microcalcifications représentent les premiers stades de la formation des petites particules de calcium intinale (Fig.27), ainsi elles sont associées aux événements critiques impliquant la génération du stress qui va induire la rupture des plaques²³⁶. Les microcalcifications sont probablement dangereuses lorsqu'elles se forment dans la chape fibreuse. Depuis longtemps l'épaisseur de la chape fibreuse est en corrélation étroite avec la vulnérabilité de la plaque³⁴. Par contre, jusqu'à maintenant, seulement des données théoriques suggèrent que les microcalcifications pourraient contribuer directement à la rupture de la plaque^{236,237,238}.

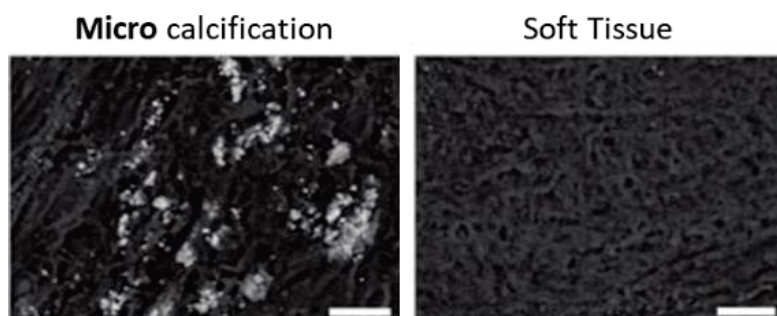


Figure 27 : Image représentative de microcalcifications. Barre d'échelle : 50 μ m.

(Adapté de ²⁴⁵)

5.2. Classification

La taille supérieure limite des microcalcifications varie entre 15 μm et 50 μm en fonction des auteurs^{236,225}. La calcification coronaire intimale peut commencer par l'apoptose des CML et la libération de vésicules matricielles dans les noyaux lipidiques au début de la lésion « PIT »^{213,225}. Cette calcification peut être identifiée comme des microcalcifications précoces de diamètre variant entre $> 0,5 \mu\text{m} - 1,5 \mu\text{m}$, généralement détectées au microscope optique par coloration von Kossa ou rouge alizarine^{236,210} (Fig.28). Ces microcalcifications précoces peuvent également se produire à partir de l'apoptose des macrophages, en particulier dans le noyau nécrotique du fibroathérome^{210,239} (Fig.28).

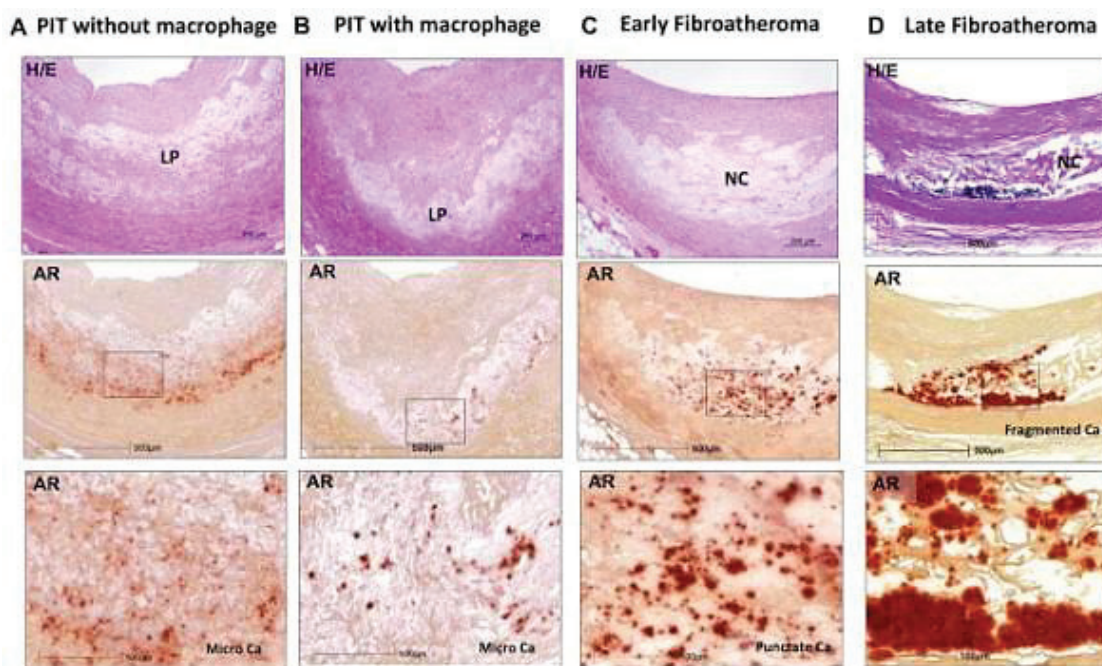


Figure 28 : Détection des différentes formes de microcalcifications coronaires dans les PIT et les fibroathéromes par coloration au rouge alizarine (AR) et à l'HE (images du haut). (Adapté de ²¹³).

Cependant les calcifications générées par l'apoptose des macrophages apparaissent comme des calcifications ponctuelles avec un diamètre variant entre 15 μm et 1 mm dans les lésions fibroathéromateuses, par rapport à celles générées suite à l'apoptose des CML²¹⁰ (Fig.29). Une étude portant sur 28 lésions coronaires précoces a démontré que 57 % des PIT sans macrophages présentaient des « microcalcifications précoces » mais aucune d'entre elles n'avait une microcalcification ponctuelle, alors que 44 % des PIT avec macrophages et 83 % des fibroathéromes précoces présentaient des microcalcifications ponctuelles²¹⁰. Enfin, les microcalcifications ponctuelles peuvent fusionner pour former des larges calcifications, nommées « *fragmented calcification* » dans les fibroathéromes tardifs (déjà détaillé dans la partie macrocalcification).

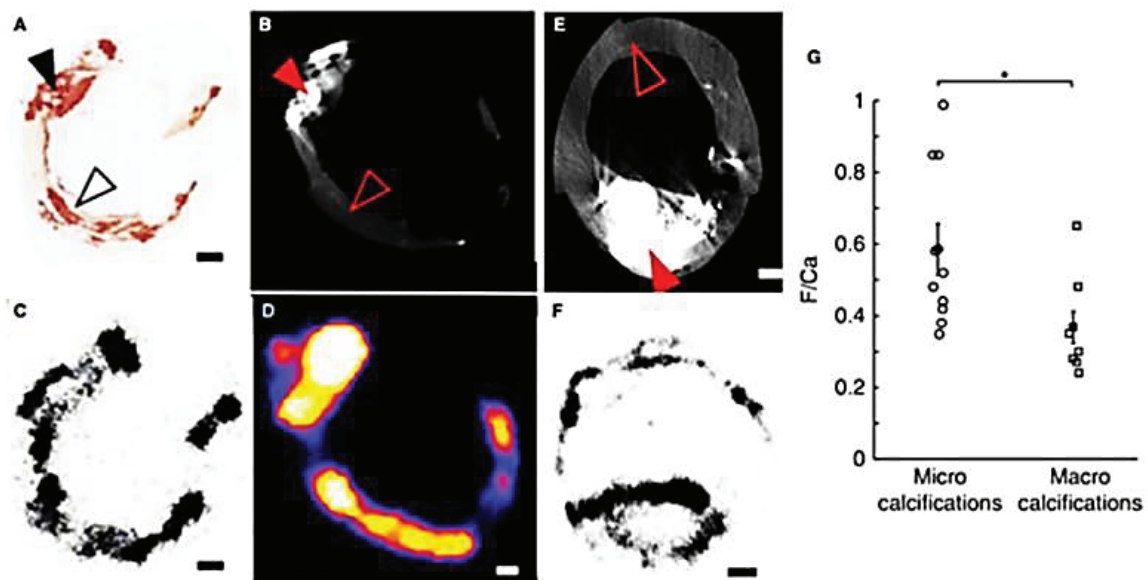


Figure 29 : Le Na^{18}F se lie préférentiellement aux microcalcifications. Images ex-vivo d'une carotide humaine excisée d'un patient présentant un accident vasculaire cérébral (AVC). (A-B) coupe histologique d'une plaque colorée avec le rouge alizarine ou observée par micro-CT, respectivement. La flèche noire remplie montre une zone de macrocalcifications qui est visible par micro-CT ((B) flèche rouge remplie). Par comparaison la flèche noire vide montre des zones de microcalcifications (A) qui sont au-dessus de la résolution du micro-CT ((B) flèche rouge vide). Par comparaison avec (C- D), elles démontrent une liaison importante du Na^{18}F par autoradiographie (C) et par TEP (D). (E) un deuxième échantillon d'une carotide humaine, démontre un dépôt important de macrocalcifications (flèche rouge remplie) par micro-CT. (F) l'autoradiographie montre finalement que, bien que le Na^{18}F soit capable de se lier à la surface de la plaque, il est incapable de pénétrer dans le centre. (G) la quantité de fluorure adsorbé à la surface des microcalcifications est significativement plus élevée que dans les macrocalcifications. (Adapté de ²³⁰).

5.3. Détection

Toutes les techniques d'angiographie invasive sont limitées dans leur capacité à identifier les microcalcifications. La résolution de la tomodensitométrie est trop faible pour détecter les microcalcifications. La visualisation non invasive des microcalcifications a été difficile jusqu'à récemment. L'imagerie par Na^{18}F en TEP permet d'obtenir des informations sur le processus pathologique de la calcification vasculaire tout en arrivant à détecter les microcalcifications, grâce à la fixation du Na^{18}F à la place des ions hydroxyle dans les cristaux d'apatite immatures nouvellement formés²⁴⁰ (Fig.29). La combinaison de l'imagerie TEP avec d'autres modalités d'imagerie structurale (par exemple le CT) peut fournir une évaluation quantitative de la calcification et de la vulnérabilité de la plaque⁸. Cependant, il est maintenant établi que non seulement les microcalcifications mais aussi les plus grosses calcifications en croissance active sont positives au Na^{18}F , ce qui complique l'interprétation clinique du Na^{18}F TEP/CT²²⁸ (Fig.29).

5.4. Inflammation et vulnérabilité

Des données expérimentales sur des modèles humains et animaux suggèrent que l'inflammation déclenche les microcalcifications. L'étude clinique d'Abdelbaky en 2013 par TEP Na^{18}F , a révélé que l'inflammation artérielle précède le dépôt de calcium au même endroit²⁴¹. De même, dans le modèle de souris $\text{ApoE}^{-/-}$, l'imagerie « *near-infrared spectroscopy* » a révélé que l'inflammation précède la calcification²⁴². Ces résultats ont été validés in vitro sur des CML humaines, où la calcification de ces cellules a montré la présence des phénotypes pro-inflammatoires et non pas ostéochondrocytaires²⁴³.

De plus, plusieurs études ont montré que les CML peuvent elles-mêmes provoquer une réponse pro-inflammatoire dans les macrophages et exacerber l'inflammation de la plaque, en induisant un épaississement de la chape fibreuse et entraînant sa rupture^{232,244}. La progression des lésions calcifiées peut se faire par la trans-différentiation ostéochondrocytaire des CML via leur stimulation avec des cytokines pro-inflammatoires telles que le $\text{TNF-}\alpha$ produit par les macrophages de type M1²⁴⁴. Cependant, ces conditions inflammatoires chroniques présentes dans les lésions progressives de la plaque peuvent altérer l'ostéogenèse ordonnée ainsi que la maturation ostéochondrocytaire des CML, entraînant des dépôts calcifiés désorganisés. Une inflammation chronique non régulée et persistante a été montrée comme retardant la stabilisation des plaques²⁴⁵ (Fig.30).

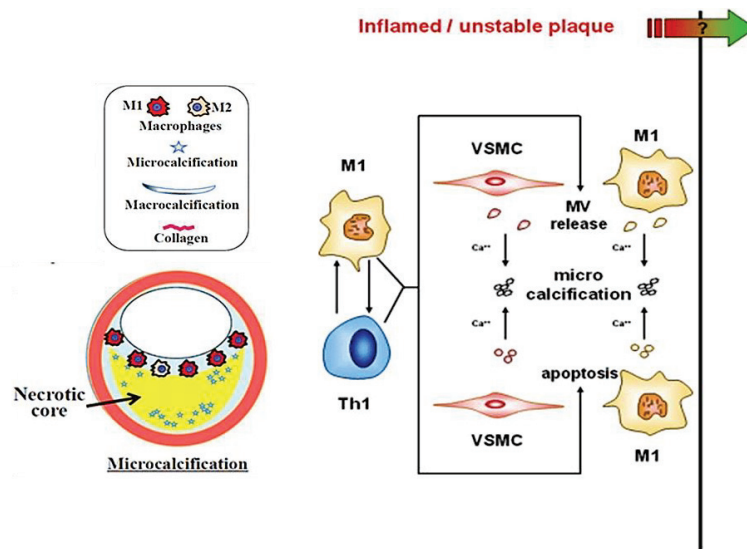


Figure 30 : Mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation du modèle de la calcification athéroscléreuse. Les CML et les macrophages participent à la formation des microcalcifications précoces, en subissant une apoptose avec la formation des corps apoptotiques et la libération de vésicules matricielles, qui sont les sites initiaux de dépôt de Ca^{2+} et la nucléation d'apatite en vue de la formation des microcalcifications. Les macrophages de types (M1) contribuent avec les lymphocytes de types (Th1) au maintien et à la propagation du processus inflammatoire. (Adapté de ^{243,250}).

- **Comment ces microcalcifications interagissent pour provoquer le stress de la plaque ?**

Les micro calcifications sont retrouvées dans presque toutes les coiffes fibreuses. Elles sont plus susceptibles d'être hétérogènes, mais seulement un petit sous-ensemble seraient responsables d'un stress qui provoque la rupture des plaques²³⁶. Quelques études ont suggérées que l'épaisseur de la coiffe fibreuse et la localisation des microcalcifications sont corrélées au risque de la rupture des plaques^{237,246}.

Les microcalcifications peuvent provoquer le transfert d'un stress régional élevé. Les vagues de ce stress se déplacent de l'interface entre la coiffe fibreuse et le noyau lipidique à l'interface entre la coiffe fibreuse et la lumière du vaisseau, conduisant à la rupture de la plaque²⁴⁷. Cependant, d'autres études suggèrent que les microcalcifications peuvent augmenter le stress local indépendamment de la taille et la position dans la chape fibreuse²³⁶.

Si les microcalcifications sont situées dans des régions où le stress intra plaque est élevé, le stress dû aux microcalcifications pourrait ne pas être suffisamment important pour provoquer une rupture, en particulier dans la région où la chape fibreuse est mince²³⁶. Néanmoins, lorsque deux microcalcifications sont situées à proximité, le facteur de concentration de stress augmente de façon exponentielle et toute la région est exposée à un stress élevé ²³⁶. Ce n'est que lorsque cette augmentation considérable du stress se produit à un endroit où le stress de la plaque est presque suffisant pour se rompre que la rupture de la chape fibreuse a lieu. Sur la base de ces résultats, les petites particules telles que les micro calcifications $< 5 \mu\text{m}$ ne sont pas nocives en raison de leur force insuffisante à causer la rupture²³⁶.

6. Mécanismes impliqués dans la calcification des plaques athéroscléreuses

Actuellement, les mécanismes sous-jacents qui expliquent la formation de la calcification vasculaire expliquent en même temps comment l'inflammation déclenche cette calcification dans les plaques d'athéroscléroses.

Les macrophages peuvent :

- 1- Favoriser la calcification via l'apoptose ou la nécrose cellulaire²¹³.
- 2- Induire la calcification vasculaire en libérant des vésicules extracellulaires²⁴⁸.
- 3- Induire la calcification en libérant des facteurs pro-inflammatoires, comme par exemple le TNF- α , qui agissent en stimulant les CML indépendamment de la trans-différentiation mais simplement en diminuant la sécrétion du MGP ou le niveau de PPI extracellulaire²⁴⁹.
- 4- Stimuler la calcification via la transdifférentiation des CML en cellules de type ostéochondrocytaire^{250,251}.

6.1. Calcification et apoptose

Dans les conditions physiologiques le calcium (Ca^{2+}) et le phosphate inorganique (Pi) dépassent presque leur solubilité dans la plupart des tissus, mais pourtant la calcification ne se produit pas grâce à la présence des inhibiteurs circulants et locaux tels que PPI et MGP respectivement. La calcification intracellulaire est normalement empêchée par la séparation physique des ions calcium (stockés dans le réticulum endoplasmique) et du phosphate inorganique (présent dans le cytoplasme). La dérégulation de ces mécanismes conduit à une minéralisation pathologique. Par exemple, les souris MGP^{-/-} sont connues pour développer une calcification vasculaire rapide et étendue²⁵². L'action spécifique de MGP n'est pas encore clairement comprise, mais pourrait être impliquée dans l'inhibition fonctionnelle de BMP (par ex, BMP-2 et BMP-4), en bloquant le dépôt de cristaux de calcium et en protégeant le nidus de la calcification²⁵³, ce qui suggère que la calcification aortique chez les souris MGP^{-/-} peut être due soit à une activité BMP, ou soit à une croissance minérale.

Les plaques athéroscléreuses contiennent souvent une abondance de macrophages ainsi que d'autres types de cellules. Il est donc probable que divers types cellulaires puissent subir une apoptose à différents endroits dans les plaques athéroscléreuses, et ainsi produire des corps apoptotiques (AB) enrichis avec des quantités variables de protéines, de calcium et de phosphate. Cependant, lorsque les AB ne sont pas rapidement phagocytés par les macrophages, ils subissent une nécrose caractérisée par une rupture de la membrane permettant la précipitation non spécifique du calcium et du Pi. La phagocytose des débris apoptotiques est altérée dans la plaque athéroscléreuse et la calcification dans les plaques précoces sur les débris apoptotiques est importante¹¹⁸. L'examen histologique de milliers d'artères coronaires a révélé que les microcalcifications se forment souvent à proximité des CML apoptotiques et que les macrophages apoptotiques calcifiants sont souvent associés à des calcifications ponctuées (*Punctate calcification*) résultant de microcalcifications²¹³

(Fig.31). Le rôle de l'apoptose dans l'initiation de la calcification est renforcé par des études *in-vitro* qui ont montrées l'association étroite entre l'inhibition de l'apoptose et la réduction de la calcification dans les CML humaines²⁵⁴. Toutes ces données suggèrent que la nécrose augmente la calcification de la plaque. En plus de la nécrose classiquement décrite, la nécrose programmée, également connue sous le nom de nécroptose, pourrait participer à la calcification de la plaque. Les souris déficientes en RIP3 (RIP3^{-/-}) développent des cœurs nécrotiques plus petits que les souris Ldlr^{-/-134}. Les souris RIP3^{-/-} présentent aussi des plaques moins inflammatoires et une mortalité plus tardive par rapport aux souris ApoE^{-/-255}.

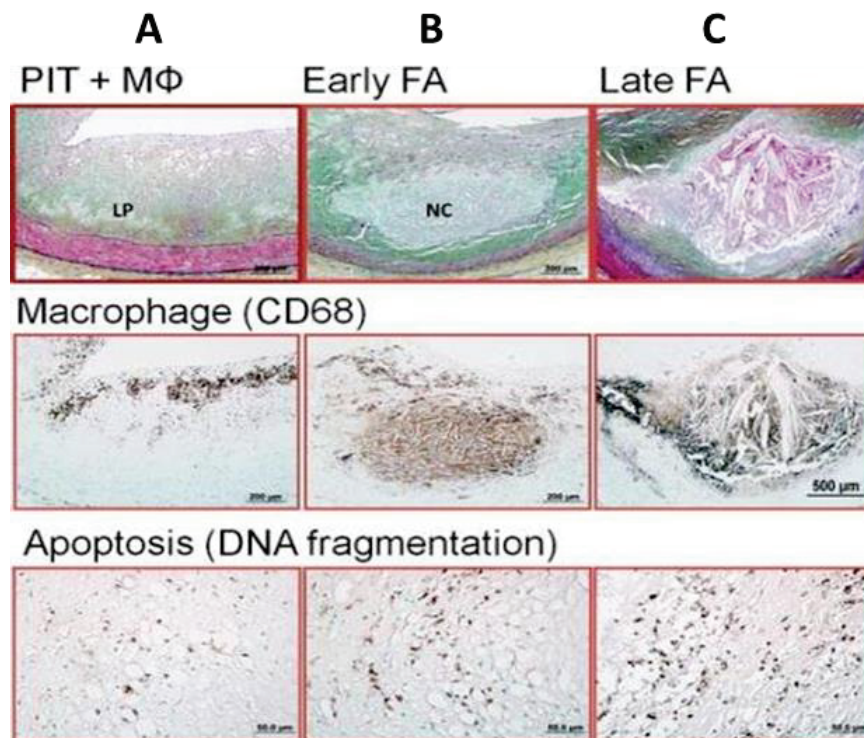
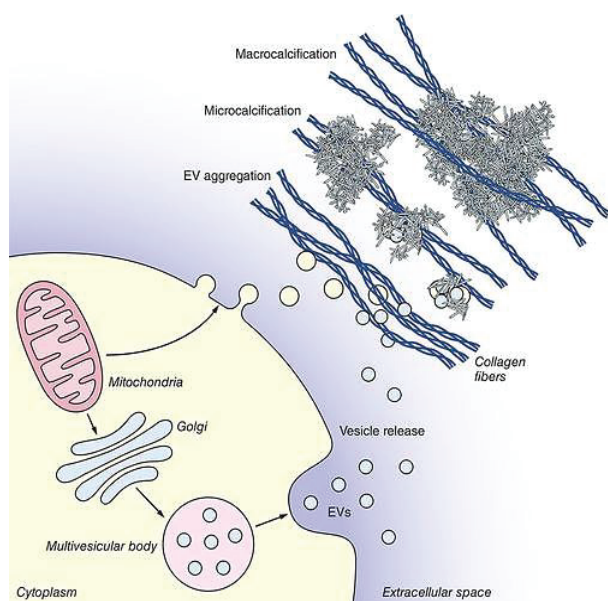


Figure 31 : Mécanismes de propagation du noyau nécrotique dans les plaques coronaires humaines. (A) PIT est caractérisée par un LP, où la majorité des macrophages présents se limitent à la surface de la plaque (proche de la lumière), les cellules apoptotiques sont rarement observées dans le PIT. (B) la présence d'un NC infiltré par des macrophages CD68+, caractérise le stade précoce du FA (fibroathérome), les macrophages au début de la FA sont capables de phagocyter les corps apoptotiques. (C) FA tardive est représentée par une augmentation de la mort des macrophages et de la lyse cellulaire, des corps apoptotiques libres sont couramment observés, ce qui peut indiquer une clairance déficiente par les macrophages résidents. (Adapté de ²⁷).

6.2. Calcifications et vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (VE) sont de petits corps sphériques d'origine cellulaire trouvés en association avec des dépôts cristallins²⁵⁶. En se basant sur la taille, les VE peuvent être classés en trois sous types, les exosomes (10 - 100 nm), les microvésicules (100 - 500 nm) et les corps apoptotiques (> 1000 nm)^{257,258}.

Les VE peuvent être libérées par la plupart des cellules, par exemple des VE dérivées de CML¹⁶⁵, des VE dérivées de chondrocytes et d'ostéoblastes^{259,260} ainsi que des VE dérivées de macrophages²³⁹. Ces vésicules libérées dans la paroi vasculaire interagissent avec le collagène et peuvent alors servir de site de nucléation pour la cristallisation des minéraux calcifiés, tout en agissant comme des précurseurs actifs pour les microcalcifications²⁵⁸ (Fig.32). L'exploration au microscope électronique des plaques carotidiennes humaines a révélé que les plaques vulnérables peuvent contenir plus de VE calcifiantes que les plaques stables²⁶¹. Cependant les mécanismes d'interaction entre les VE et le collagène, entraînant la formation de microcalcifications ou des macrocalcifications, restent inconnus. Les macrophages libèrent des VE calcifiantes contenant le complexe phosphatidylsérine-annexine V-S100A9. À la surface



de ces VE dérivées de macrophages, la phosphatidylsérine peut former des complexes avec l'annexine V et S100A9, ce qui peut favoriser l'entrée des ions calcium dans les vésicules. D'autre part, les phosphates entrant dans les vésicules s'accumulent sous la forme d'un complexe calcium-phosphate sur la face interne de la membrane et forment les cristaux d'hydroxyapatite initiaux. Par la suite, les cristaux d'hydroxyapatite continuent de croître jusqu'à ce que la membrane se rompe, se lie à la matrice et se développent pour former des nodules calcifiés.

Figure 32 : Vésicules extracellulaires (EV), moteurs de la calcification vasculaire.

(Adapté de ²⁶²).

Les VE dérivées de macrophages augmentent l'expression des MMP. Les MMP sécrétées par les macrophages sont une famille d'endopeptidases zinc-dépendantes qui jouent un rôle crucial dans plusieurs processus pathologiques. MMP-9 améliore l'infiltration des macrophages vers le site de la lésion et la dégradation de la matrice extracellulaire. Une augmentation de MMP-9 peut également hydrolyser l'élastine et les peptides dérivés de l'élastine contribuent à la différenciation ostéogénique des CML. De plus, MMP-10 dérivée de macrophages favorise l'expression de BMP-2 et Runx-2 et facilite le développement de la calcification vasculaire via le mécanisme impliquant la phosphorylation Akt²⁶³.

6.3. Calcification des plaques par ossification endochondrale chez la souris

Puisqu'il est évidemment extrêmement difficile d'analyser le processus longitudinal de calcification des plaques chez l'homme, les souris athéroscléreuses ont été largement utilisées pour étudier ce processus. Deux modèles murins ont été explorés en profondeur : les souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}) et les souris déficientes en récepteur des lipoprotéines de basse densité (Ldlr^{-/-}). Lorsque des souris déficientes en ApoE^{-/-} reçoivent un régime riche en gras à partir de 10 semaines, des calcifications sont détectées dans l'aorte dès la semaine 20²⁴². L'examen histologique d'aortes d'animaux âgés de 45 à 75 semaines a révélé la présence de cellules de type chondrocytaire exprimant le collagène de type II dans les régions calcifiées, suggérant que la calcification de la plaque se développe par un processus mimant l'ossification endochondrale^{264,265}. L'observation de chondrocytes avant l'apparition des calcifications, a permis aux auteurs de cette étude de conclure que la calcification de la plaque résulte d'une métaplasie du cartilage²⁶⁵. Si la calcification de la plaque est un processus actif reposant sur la différenciation des chondrocytes et si les CML sont impliquées, alors la suppression de Runx2 dans les CML devrait l'empêcher, et en effet, la calcification dans les plaques murines repose sur le changement phénotypique des CML en chondrocytes^{161,162}. La calcification vasculaire observée chez les souris ApoE^{-/-} et les souris Ldlr^{-/-} nourries avec un régime riche en gras, ainsi que la calcification vasculaire spontanée observée chez les souris MGP^{-/-} dépendent de la signalisation des protéines osseuses BMP, qui sont de puissants facteurs ostéogéniques nécessaires à la formation osseuse^{266,267,268}. La surexpression de BMP-2 accélère le développement de la calcification vasculaire.

6.4. Des calcifications plutôt par formation osseuse chez l'homme ?

De nombreux régulateurs clés de la formation osseuse sont exprimés dans les plaques athéroscléreuses humaines, y compris BMP-2²⁵³ ou le facteur de croissance fibroblastique (FGF)²⁶⁹. Cependant, les études chez l'homme montrant la présence de chondrocytes ou de cartilage sont rares et restent controversées^{270,271,272}. De plus, les structures de type osseux, qu'elles soient formées par ossification endochondrale ou endomembranaire, ne sont pas le type de calcification le plus courant dans les plaques humaines²¹³. Elles sont fréquemment observées dans les artères fémorales mais pas dans les carotides²¹⁵, et 15 % des plaques athéroscléreuses carotidiennes et du tissu valvulaire cardiaque calcifié présentent une ossification^{273,274}. Un nombre croissant d'études sur les microcalcifications dans les plaques précoces indiquent qu'elles se forment indépendamment de cellules de types ostéoblastique ou chondrocytaire. Par exemple, dans les artères coronaires, des microcalcifications ont été observées dans des lésions de type I avant que la BMP-2 ou l'ostéocalcine soient détectées^{243,275}. Il est vraisemblable que, dans ces études, des chondrocytes ou des ostéoblastes aient été présents mais pas détectés à cause des microcalcifications qui s'étaient développées et avaient fusionnées en générant des macrocalcifications, qui sont, elles, dépourvues d'activité ostéoblastique ou chondrocytaire.

7. Perspective clinique

La détection précoce de la calcification des artères (par la mesure du CAC) chez les sujets les plus jeunes a un impact pronostique important en termes de prédiction du futur risque de maladie coronarienne²⁷⁶. Cependant, il est difficile de prédire de manière fiable la probabilité d'avoir un événement cardiovasculaire, ni quand et où celui-ci se produira. Alors que chez les patients les plus âgés, la proportion de plaque fibrocalcique, rupture de plaque et de plaque cicatrisée est plus élevée, ce qui donne à ces plaques un CAC beaucoup plus élevé. Certaines de ces plaques peuvent rester stables et/ou peuvent développer une sténose sévère sans thrombose, ou continuer à former un nodule calcifié entraînant une thrombose, bien que le mécanisme de base ne soit pas toujours clair. D'un point de vue pathologique, il ne suffit pas de regarder le score CAC pour comprendre la complexité de la maladie coronarienne, bien que cela soit très pratique cliniquement. Nous croyons que la présence des petites calcifications (*micro, punctate, spotty*) est un meilleur prédicteur de la plaque instable, alors que la présence des larges calcifications (*fragmented, diffuse*) est un meilleur prédicteur de la plaque stable. Pour obtenir une prédiction plus précise, un nouveau système de notation CAC basé sur une imagerie CT à plus haute résolution que celle actuellement disponible est justifié (Fig.33). Une attention particulière doit être dirigée vers la collecte d'informations concernant la calcification précoce compatible avec un risque plus élevé de syndromes coronaires instables par rapport à ceux avec une calcification plus diffuse observée dans une maladie stable.

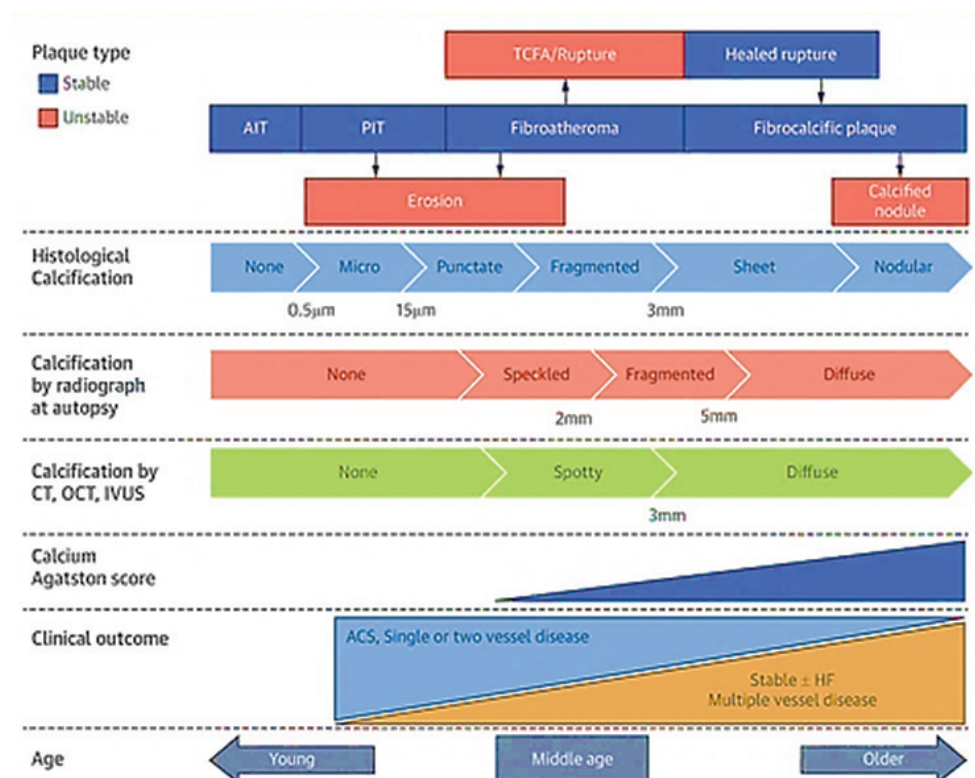


Figure 33 : Schéma conceptuel de la calcification de l'artère coronaire par type de plaque (stable et instable), histologie, évaluation radiographique non invasive (CT, score d'Agatston) et invasive (OCT, IVUS) avec résultat clinique basé sur l'âge des patients. (Adapté de ²⁰⁵).

Chapitre 3. Phosphatase alcaline non spécifique du tissu

I. Phosphatase alcaline non spécifique du tissu « TNAP »

1. Généralités

Les phosphatases alcalines (EC 3.1.3.1) (PA, phosphomonoestérases) sont des enzymes distribuées largement dans les organismes, des bactéries jusqu'aux humains. Elles sont dimériques, liées à la membrane via un ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les PA catalysent l'hydrolyse des liaisons phosphomonoesters à pH élevé (pH 8 - 10), mais aussi à pH neutre, éliminant un groupement phosphate du substrat²⁷⁷. Les PA humaines sont composées de quatre types différents, trois PA spécifiques du tissu et la **PA non spécifique du tissu ou TNAP**, classés comme :

1. Intestinale (IAP, ALPI, NCBI Gene ID : 248).
2. Placentaire (PLAP, ALPP, NCBI Gene ID : 250).
3. Germinale (ALPG, ALPPL2, NCBI Gene ID : 251).
4. **Non spécifique du tissu (TNAP, TNSALP, NCBI Gene ID : 249)**

Les PA spécifiques des tissus sont de 90 % à 98 % homologues, alors que la TNAP est homologue à 50 % au trois autres PA spécifiques des tissus²⁷⁸. La différence entre les isoformes de la TNAP dans chaque tissu réside dans leurs modifications post-traductionnelles (glycosylation) qui influencent et déterminent leur activité catalytique²⁷⁹.

La TNAP est exprimée dans de nombreux tissus dans tout le corps, mais son activité la plus élevée est trouvée dans les os, le foie et les reins (raison pour laquelle elle a longtemps été appelée PA os/foie/reins). La TNAP est une glycoprotéine homodimérique ancrée à la membrane plasmique via son extrémité carboxyle terminale par le fragment GPI²⁸⁰ (Fig.34). L'interface monomère-monomère présente un fort caractère hydrophobe crucial pour la stabilité et la fonction enzymatique²⁸¹. La TNAP possède plusieurs domaines, y compris le site actif et plusieurs domaines spécifiques aux mammifères, comme un domaine de liaison au Ca^{2+} qui n'altère pas l'activité catalytique de la TNAP et un domaine « couronne » qui stabilise la liaison des inhibiteurs non compétitifs et détermine les propriétés des isoenzymes spécifiques, comme la stabilité thermique et l'association au collagène²⁸². Le site actif contient trois sites de liaison aux métaux entourant le résidu sérine catalytique qui sont essentiels pour l'activité enzymatique de la TNAP : deux sites de liaison pour deux ions Zn^{2+} et un site de liaison pour un ion Mg^{2+} (Fig.34). Bien que la TNAP possède une large spécificité et puisse cliver le phosphate de plusieurs substrats, ses substrats physiologiques naturels démontrés sont le pyrophosphate inorganique (PPi) et le pyridoxal phosphate (PLP, forme active de la vitamine B6) (Fig.34). Le PLP, un coenzyme qui est nécessaire pour plus de 150 réactions

enzymatiques²⁸³, est également un substrat physiologique de la TNAP dans les leucocytes^{284,285}. Bien que les conséquences physiologiques de l'action de la TNAP sur le PLP restent largement inconnues, chez les adultes l'influence de la TNAP est liée à une variation des concentrations plasmatiques de PLP²⁸⁶. Le métabolisme anormal du PLP peut également expliquer les crises d'épilepsie que connaissent certains patients atteints d'hypophosphatasie²⁸¹.

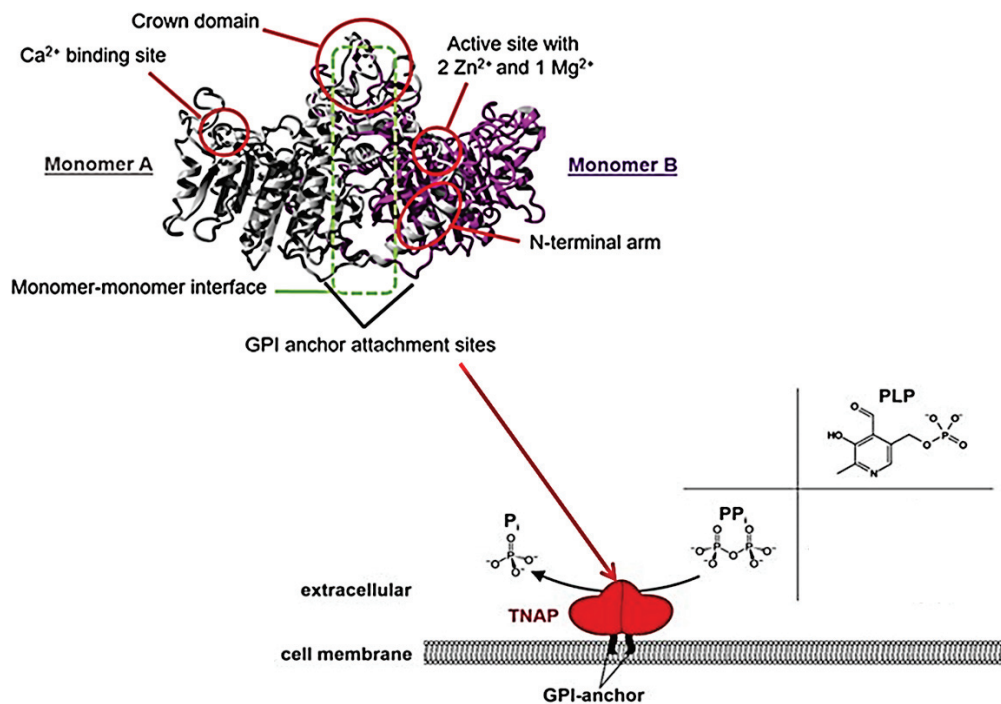


Figure 34 : Structure et substrats de la TNAP. (Adapté de ²⁸⁷).

2. Fonction physiologique principale : la minéralisation

L'os est formé de cellules et d'une matrice extracellulaire (MEC) collagénique minéralisée. La formation osseuse est effectuée selon deux processus, soit par ossification endochondrale, en particulier dans les os longs, soit par ossification intramembranaire dans les os plats. Lors de l'ossification endochondrale, les ostéoblastes forment de l'os sur une matrice cartilagineuse, tandis que lors de l'ossification intramembranaire, ils produisent de l'os sans avoir besoin de cette matrice cartilagineuse. Dans les deux cas, les chondrocytes et les ostéoblastes expriment la TNAP sous le contrôle du facteur de transcription Runx2²⁸⁸. Dans le premier processus, les cellules mésenchymateuses se différencient en chondrocytes pré-hypertrophiques sous le contrôle du facteur de transcription Sox9, où elles produisent une matrice riche en collagène dont le composant majeur est le collagène de type II, ensuite elles deviennent matures en chondrocytes hypertrophiques (prolifératifs) sous le contrôle du facteur de transcription Runx2, où elles sécrètent du collagène de type X²⁸⁹. Dans les stades

tardifs de ce processus, la TNAP est exprimée dans des chondrocytes hypertrophiques, où elle hydrolyse le PPI extracellulaire permettant la minéralisation de la matrice cartilagineuse^{290,291} (Fig.35). Dans le deuxième procédé, les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes, cellules qui ont pour fonction principale la synthèse de la matrice extracellulaire dont le composant majeur est le collagène de type I. La différenciation plus tardive est caractérisée par la sécrétion d'ostéocalcine (OCN), responsable du contrôle hormonal de la glycémie par les ostéoblastes²⁹² (Fig.35).

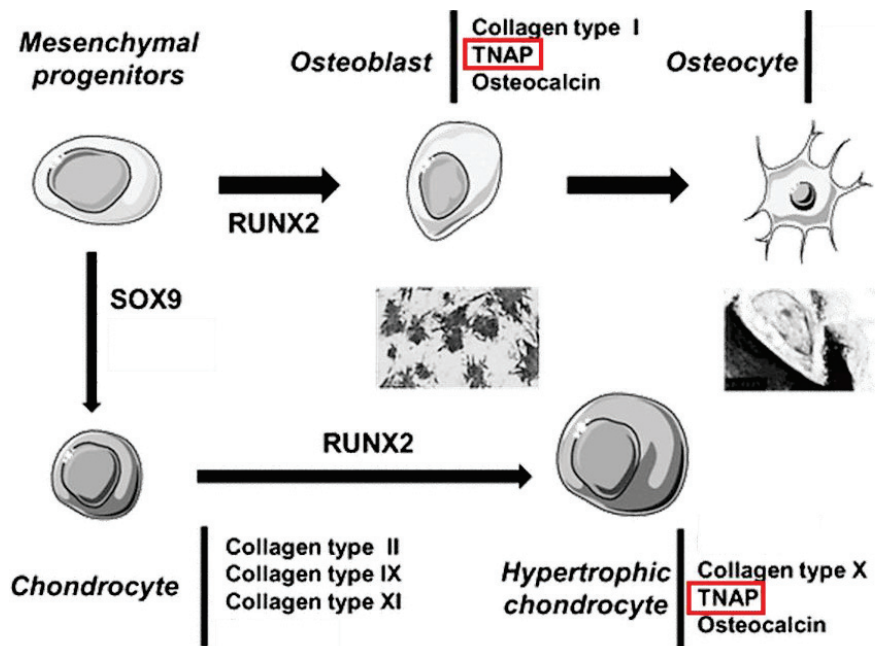


Figure 35 : Facteurs de transcriptions et marqueurs impliqués dans la transdifférenciation ostéochondrocytaire à partir de progéniteurs mésenchymateux.

(Adapté de²⁵⁰).

Ces deux types d'ossification résultent d'un processus de minéralisation physiologique en formant les cristaux d'hydroxyapatite selon deux théories principales, la matrice du collagène et les vésicules matricielles, l'acteur clé responsable du processus de la minéralisation physiologique, étant la TNAP²⁹³.

La théorie de la matrice de collagène est ancienne²⁹⁴. Cette idée propose que les lacunes dans les fibrilles de collagène permettent l'accumulation, la précipitation de Ca^{2+} et Pi , ainsi que la formation des cristaux d'hydroxyapatite. La minéralisation de la MEC est un processus physiologique dans les os et pathologique dans les autres tissus. L'os stocke également 98 % et 85 % du Ca^{2+} corporel total et du Pi , respectivement^{295,296}. Une concentration normale de phosphate extracellulaire est nécessaire pour la minéralisation de la MEC. Inversement, l'abaissement de cette concentration empêche la minéralisation de la MEC. Cependant, la simple augmentation de la concentration en phosphate extracellulaire n'est pas suffisante pour induire une minéralisation pathologique, en raison de la présence dans toutes les MEC

de PPi, substrat de la TNAP ainsi qu'inhibiteur puissant de la minéralisation. La minéralisation de la MEC se produit uniquement dans les os, en raison de la co-expression du collagène de type I et de la TNAP dans les ostéoblastes. Cette double exigence explique pourquoi l'expression ectopique de la TNAP dans les cellules fabriquant du collagène est suffisante pour induire une minéralisation pathologique²⁹⁷.

Le concept des vésicules matricielles (VM) a, quant à lui, été proposé pour la première fois à la fin des années 1960 suite à l'étude d'Anderson et Bonnucci, qui ont montré que ces VM étaient impliquées dans la minéralisation^{298,299}. Les VM sont une forme spécialisée de vésicules extracellulaires, avec un diamètre entre 100 et 300 nm, sont sécrétées dans la matrice extracellulaire par les ostéoblastes et les chondrocytes à l'état hypertrophique pour induire la minéralisation²⁵⁹. Les VM initieraient la nucléation des cristaux d'HA au contact de la membrane, dans leur lumière. Puis, soit sous l'action des forces mécaniques et/ou soit sous l'action de lipases, les cristaux d'HA perceraient la membrane des VM. La croissance des cristaux d'HA continuerait alors dans l'espace extravésiculaire^{300, 301}. De manière critique, le PPi inhibe la croissance, des cristaux d'HA. Par conséquent il n'est pas surprenant que plusieurs protéines dans l'organisme existent pour réguler le rapport Pi/PPi afin de maintenir la minéralisation physiologique et éviter une minéralisation pathologique. L'ectonucléotide pyrophosphate phosphodiesterase, ENPP1, inhibe la minéralisation par la génération extracellulaire du PPi via l'hydrolyse de l'ATP. La protéine codée par le gène de l'ankylose progressive (ANK) facilite le transport du PPi intracellulaire au milieu extracellulaire³⁰². Inversement, la TNAP qui est ancrée dans la membrane des ostéoblastes, des chondrocytes et des VM, hydrolyse le PPi pour supprimer cet inhibiteur et stimuler la minéralisation³⁰³ (Fig.36).

L'importance de la TNAP dans la minéralisation squelettique est mise en évidence par les mutations dans le gène humain *ALPL* codant pour la TNAP. Ces mutations provoquent une hypophosphatasie (HPP), maladie osseuse métabolique héréditaire rare, caractérisée par une hypominéralisation squelettique due à un déficit de la TNAP et une accumulation extracellulaire de PPi^{304,305}. La forme la plus sévère de l'HPP entraîne la mort périnatale de fœtus complètement dépourvus de minéraux osseux³⁰⁶. De même, la suppression du gène murin *Akp2* codant pour la TNAP chez la souris, provoque des symptômes similaires à ceux de l'hypophosphatasie^{307,308}.

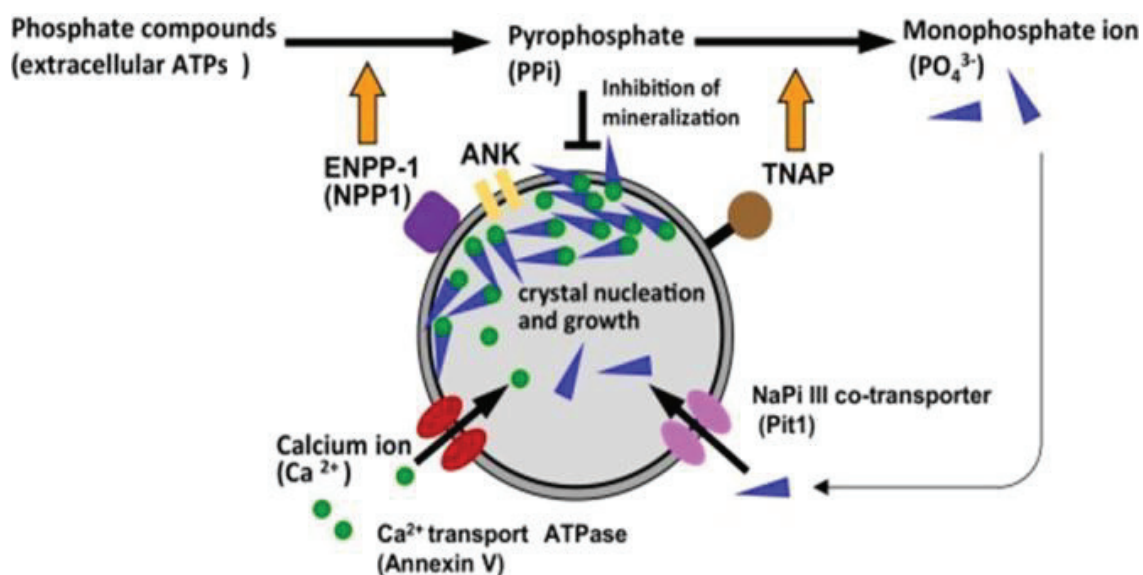


Figure 36 : Schéma représentatif de la minéralisation à médiation des vésicules matricielles et de la TNAP. Les VM fournissent des micro-conditions adéquates pour l'initiation de la minéralisation. Les transporteurs membranaires et les enzymes dont la TNAP, ENPP1, Annexine, ANK et Pit1 présents sur les VM jouent un rôle central dans le transport du Ca^{2+} et du Pi (PO_4^{3-}) dans les vésicules. (Adapté de ³⁰⁹).

3. Possibles fonctions inflammatoires de la TNAP

Les nucléotides, et en particulier l'ATP, sont surtout connus pour leur rôle énergétique intracellulaire et leur participation à la formation des acides nucléiques. Cependant, l'ATP a une fonction complètement différente dans le compartiment extracellulaire puisqu'elle fonctionne comme une molécule signalant un danger. L'ATP extracellulaire libérée par toutes les cellules de l'organisme lors de la nécrose, l'apoptose ou en réponse à des stress inflammatoires ou mécaniques³¹⁰ via des canaux transmembranaires comme les pannexines et les connexines, se lie aux récepteurs nucléotidiques dits récepteurs purinergiques P2 présents à la surface des cellules et active de multiples voies intracellulaires. Ces récepteurs P2 sont répartis en deux groupes distincts : les récepteurs métabotropes P2Y qui sont couplés aux protéines G et les récepteurs ionotropes P2X qui sont des canaux ioniques. Lorsque sa concentration extracellulaire est élevée, l'ATP se fixe notamment à son récepteur P2X7 et agit comme une molécule pro-inflammatoire déclenchant l'activation de l'inflammasome (NLRP3) et ainsi la sécrétion de cytokines l'IL-1 β .

La réponse inflammatoire peut être limitée dans le temps et l'espace par la génération d'adénosine, à partir de l'ATP extracellulaire, essentiellement par deux ectonucléotidases membranaires, CD39 et CD73, qui interviennent pour limiter l'action autocrine de l'ATP (Fig.37).

CD39 est une protéine membranaire responsable de la déphosphorylation de l'ATP ainsi que de l'ADP en AMP. CD73 est une protéine dimérique associée à la membrane par l'intermédiaire d'une ancre GPI, qui convertit l'AMP en adénosine³¹⁰. L'adénosine se lie ensuite à ses récepteurs purinergiques P1 et exerce un rôle anti-inflammatoire. Ainsi, les actions de CD39 et CD73 permettent de passer d'un environnement pro-inflammatoire induit par l'ATP à un environnement anti-inflammatoire induit par l'adénosine. ENPP1 pourrait également participer à limiter l'action de l'ATP en l'hydrolysant en AMP (Fig.37).

3.1. La TNAP sanguine : une fonction dans l'inflammation ?

La TNAP est une enzyme relativement ubiquitaire, exprimée dans plusieurs tissus et libérée dans le sang, à la fois sous forme soluble ou ancrée à la membrane des neutrophiles (les leucocytes les plus abondants dans le sang humain). La TNAP présente dans le sang sous forme d'isoforme active soluble (sans ancrage), provient principalement des os et du foie. Pendant la croissance et lorsque le squelette est en cours de construction, l'os est la principale source de la TNAP sanguine, tandis que chez les adultes âgés et lorsque la formation osseuse est ralentie³¹¹, le foie devient progressivement la principale source de la TNAP sanguine. Chez les adultes, une augmentation de l'activité de la TNAP dans le sang reflète souvent des syndromes métaboliques ou des troubles hépatiques (par exemple la cholestase, un ralentissement voire un arrêt de la sécrétion biliaire)³¹². La fonction de la TNAP dans le sang est inconnue, même si elle pourrait participer au contrôle de l'inflammation systémique.

3.2. La TNAP, une nucléotidase ?

Le rôle de la TNAP concernant l'équilibre entre les effets pro-inflammatoires de l'ATP et les effets anti-inflammatoires de son produit de dégradation, l'adénosine, a récemment retenu l'attention³¹³. Dans ce contexte, des agonistes et antagonistes chimiques ont été développés et sont actuellement étudiés dans des essais cliniques^{314,315}. L'activité ectonucléotidase de la TNAP est acceptée en tant que régulateur de la signalisation purinergique, tout en contrôlant le niveau de l'inflammation en convertissant l'ATP en adénosine³¹³ (Fig.37).

Dans le sang, la forme circulante de la TNAP peut générer de l'adénosine à partir de l'AMP pour exercer des effets anti-inflammatoires³¹⁶. Outre sa forme soluble, la TNAP est également présente dans le sang ancrée à la membrane des neutrophiles³¹⁷, où elle exerce des fonctions anti-inflammatoires³¹⁸. La forme ancrée de la TNAP pourrait soutenir la forme soluble en hydrolysant le PLP et l'AMP, mais sa présence au niveau de la membrane participe plus vraisemblablement au contrôle des effets autocrines de l'adénosine et de ses nucléotides, en particulier sur la survie des neutrophiles, la migration ou la sécrétion d'IL-1 β ^{318,319}. Enfin, la TNAP est également présente dans le sang attachée à la membrane des cellules endothéliales des artérioles et des capillaires³²⁰. Sa fonction spécifique dans les cellules endothéliales est inconnue. Elle pourrait également être liée au transport du sang vers l'endothélium ou à la déphosphorylation des nucléotides²⁸⁷. L'inhibition de la TNAP peut non seulement avoir un impact sur l'inflammation systémique mais également sur l'inflammation des tissus dans

plusieurs maladies, car les neutrophiles sont souvent les premières cellules recrutées dans les tissus enflammés (par exemple dans les plaques athéroscléreuses) où les neutrophiles sont les premières cellules à pénétrer et à stimuler l'inflammation^{88,321}.

3.3. TNAP et LPS

L'activité ectophosphatase de la TNAP a été également impliquée dans la déphosphorylation du lipopolysaccharide (LPS) bactérien pro-inflammatoire pour le détoxifier tout en agissant comme une enzyme anti-inflammatoire³²². La déphosphorylation du LPS atténue la stimulation de l'inflammasome et ainsi la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires³²³. De tels effets semblent être cliniquement significatifs, par exemple chez les nouveaux nés présentant une septicémie tardive^{324,322}.

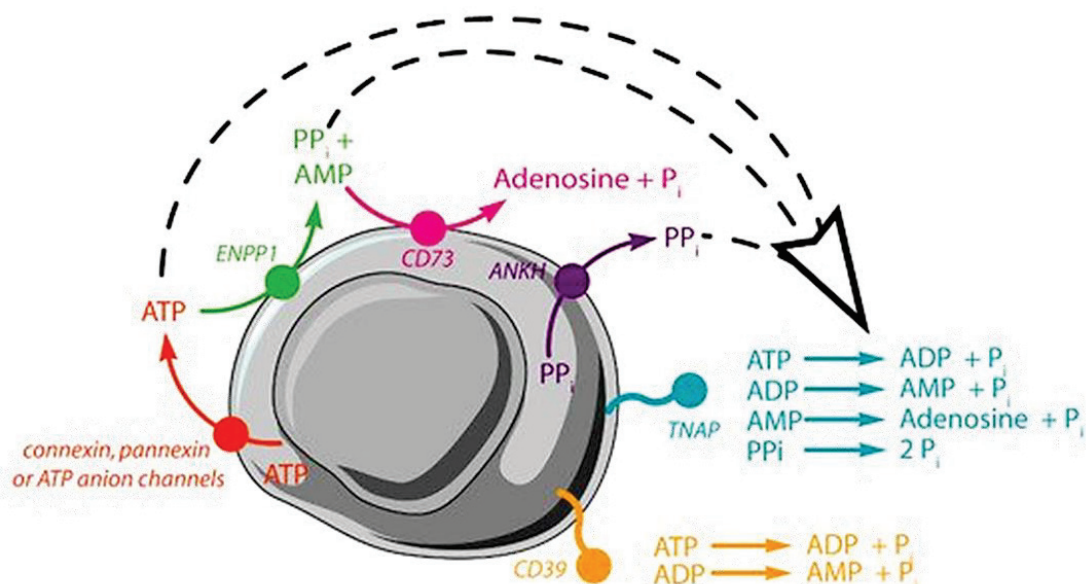


Figure 37 : Mécanismes cellulaires. L'adénosine triphosphate extracellulaire (ATP) est hydrolysée par l'ectonucléotide pyrophosphatase phosphodiesterase (ENPP1) pour former du PP_i et de l'adénosine monophosphate (AMP). L'AMP est ensuite hydrolysé par CD73 ou par la TNAP pour former l'adénosine et le P_i . L'ATP et l'adénosine diphosphate (ADP) peuvent également être hydrolysés par la TNAP ou par CD39. L'hydrolyse du PP_i qui forme $2 P_i$ est principalement catalysée par la TNAP. L'ATP peut être transporté du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire via les canaux anioniques de l'ATP, la connexine ou la pannexine, tandis que le PP_i est transporté via l'ANKH. (Adapté de ³²⁵).

4. Implications hépatiques

L'expression de la TNAP dans le foie et les reins est connue depuis longtemps, mais sa fonction dans ces tissus reste difficile à clarifier.

Dans le foie, la TNAP est localisée au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes et de la zone apicale des cellules épithéliales des voies biliaires^{326,327}. En conditions pathologiques, la choléstase est associée à une libération accrue de la TNAP hépatique dans le sang, suggérant que la TNAP participe à l'excrétion de la bile³¹². La TNAP pourrait déphosphoryler l'ATP à la surface des cholangiocytes pour participer à la régulation du pH biliaire en réponse à la sécrétion des sels biliaires³²⁸. En outre, la phosphatase alcaline intestinale peut participer à la détoxification et à l'excrétion du LPS^{324,322}. Enfin, il est possible que le foie exprime la TNAP principalement pour la libérer dans le sang chez l'adulte afin de contrôler l'inflammation systémique lorsque la formation osseuse, et donc la libération de la TNAP osseuse dans le sang, est réduite²⁸⁷.

5. Implications vasculaires

L'athérosclérose chez l'homme est une maladie à multiples facettes, avec plusieurs facteurs (Chapitre 1) présentant de forts impacts sur son initiation et sa progression³²⁹. L'ensemble de ces facteurs forme d'importants contributeurs qui soutiennent la calcification de la paroi vasculaire et des plaques athéroscléreuses³²⁹. Les personnes âgées et les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) et/ou de diabète sont susceptibles de développer une calcification de la couche médiale des artères, entraînant une augmentation de la rigidité artérielle qui à son tour perturbe la circulation sanguine périphérique et favorise les événements cardiovasculaires. Comme la disponibilité locale du PPI est considérée comme le principal contributeur à la calcification, la TNAP peut être considérée comme un acteur clé responsable de ce processus pathologique.

La calcification vasculaire est favorisée par différents mécanismes dont la principale peut être la différenciation ostéochondrocytaire des CML. Dans des conditions normales, les CML présentes dans la couche médiale de la paroi vasculaire n'expriment pas la TNAP³³⁰. Cependant, en présence de facteurs pro-calcifiants tels que, par exemple, l'inflammation ou l'hyperlipidémie, les CML se trans-différencient en cellules ostéochondrocytaires. Ces cellules sont associées à une augmentation de l'expression des marqueurs ostéochondrogéniques comme Runx2, BMP-2 et en particulier la TNAP. De plus, l'augmentation de l'expression de la TNAP dans les artères calcifiées des patients atteints d'IRC peut contribuer à la réduction du taux de PPI plasmatique, qui est négativement corrélé à une calcification artérielle chez ces patients³³¹.

5.1. Perturbation du niveau physiologique des inhibiteurs de calcifications

L'expression des inhibiteurs de calcification comme la MGP, la fétuine-A, l'ostéopontine et le PPI dans les artères saines joue un rôle clé dans la prévention de la calcification.

La MGP est exprimée de manière endogène à la fois dans les CML et les chondrocytes, où son expression est nécessaire pour inhiber les calcifications vasculaires. Cela a été montré dans une expérience sur des souris MGP^{-/-} qui développent spontanément des calcifications vasculaires. La surexpression de MGP dans les CML empêche les calcifications, alors qu'un taux élevé de MGP circulant ne l'empêche pas³⁴⁹.

La fétuine-A est synthétisée dans le foie et les os chez les individus en bonne santé où elle est présente à des niveaux élevés dans la circulation et joue un rôle clé dans le remodelage osseux³³³. La fétuine-A est absorbée par les CML où elle réduit l'apoptose et se concentre dans les VM pour réduire la formation de cristaux d'HA³³⁴. Le principal rôle de la fétuine est d'agir comme un inhibiteur circulant de calcification en liant les ions Ca²⁺ et les HA avec une haute affinité, ce qui contribue à éliminer l'excès de minéraux de la circulation afin de prévenir une pathologie vasculaire³³⁵.

L'ostéopontine est un autre inhibiteur de calcification important pour le remodelage osseux qui est normalement exprimé dans les tissus minéralisés tels que l'os et les dents. L'ostéopontine s'accumule dans les vaisseaux calcifiés et réduit l'étendue de la calcification in vivo, car les souris déficientes en MGP et OPN présentent une calcification plus étendue que les souris monodéficientes en MGP³³⁶. L'activité TNAP augmentée dans l'IRC conduit à la déphosphorylation et l'inactivation de l'ostéopontine, réduisant son effet sur l'inhibition de la calcification.

La source principale du PPI dans les CML est l'hydrolyse de l'ATP générant l'AMP et le Pi³³⁷. Le PPI peut également être libéré dans le fluide extracellulaire pour inhiber la minéralisation, sachant que le niveau physiologique de 3 à 5 µM inhibe complètement la calcification des CML dans les aortes de rat à la fois in vitro et in vivo³³⁸. Comme l'OPN, le PPI peut être déphosphorylé par la TNAP ; par exemple chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique les niveaux élevés de la TNAP observés entraîne l'hydrolyse accrue du PPI³³⁹.

5.2. TNAP et calcifications vasculaires

Plusieurs études in vivo ont permis de suggérer l'implication pathologique de la TNAP dans les calcifications vasculaires.

La surexpression de la TNAP a été observée dans la calcification vasculaire médiale (CVM) chez les patients diabétiques, chez les patients sous dialyse et dans la calcification artérielle due à un déficit en CD73^{340,341,342,343}. De même chez les souris, une régulation à la hausse de la TNAP est également observée dans les artères calcifiées des modèles murins diabétiques, d'insuffisance rénale, ou encore chez les souris MGP^{-/-}^{344,345}. La surexpression de la TNAP chez la souris, soit dans les cellules endothéliales, soit dans les macrophages, ou encore dans les CML, induit les calcifications vasculaires (Fig.38). Des études récentes sur des modèles murins suggèrent que la surexpression de la TNAP dans les cellules endothéliales peut également favoriser la calcification vasculaire médiale et la calcification vasculaire intinale (athéroscléreuse)^{346,347}. Ainsi, vu que les macrophages sont les cellules régulatrices majeures

du processus pathologique au cours de la progression de l'athérosclérose, l'étude in vivo de Corbo et al chez la souris, a permis de vérifier que la surexpression de la TNAP dans les monocytes/macrophages induit la calcification dans les plaques athéroscléroseuses (Anthony Marco Corbo et al, 2017 ; poster).

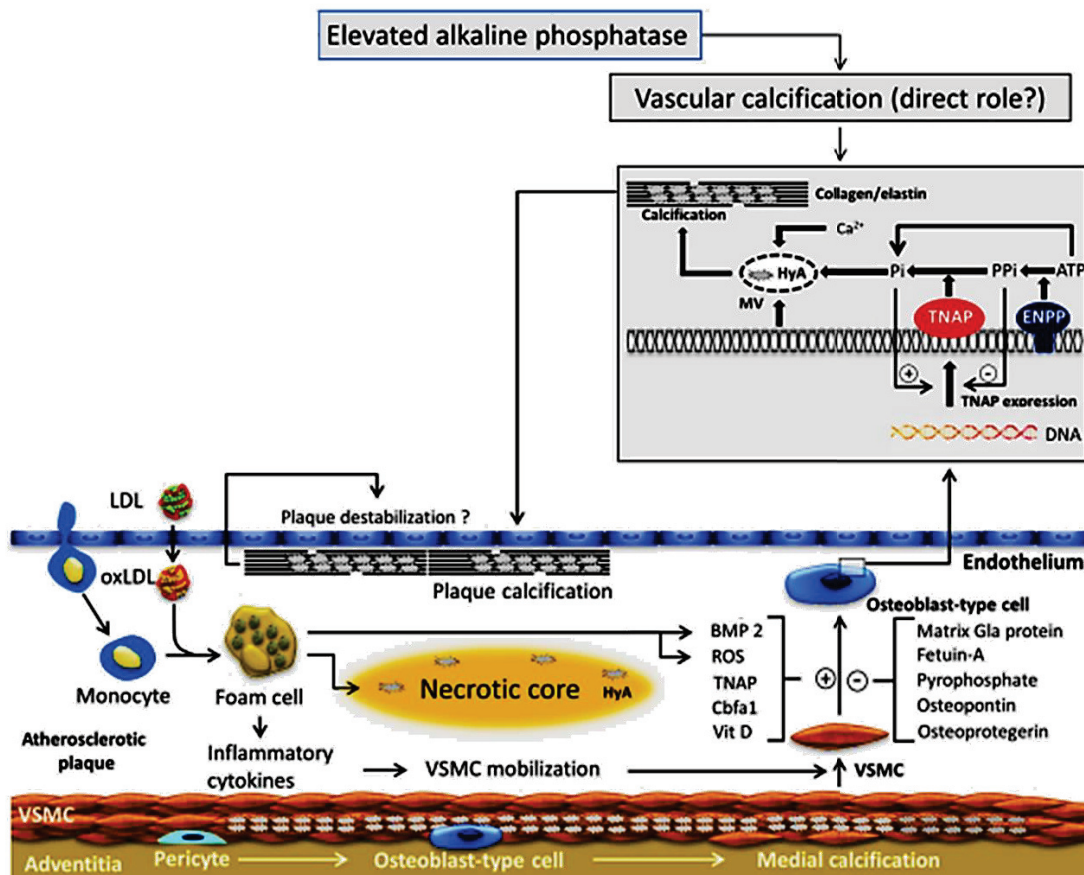


Figure 38 : Mécanismes putatifs de l'association entre la TNAP et l'athérosclérose. (Adapté de ³⁴⁸).

Chapitre 4. Modèles murins d'athérosclérose

I. Principaux modèles

Au cours des dernières décennies, la souris est devenue l'espèce prédominante pour étudier l'athérosclérose expérimentale en raison de sa reproduction rapide, de sa facilité de manipulation génétique et de sa capacité à permettre d'étudier l'athérogenèse dans un délai raisonnable³⁴⁹. Cependant, les souris sont relativement résistantes au développement de l'athérosclérose en raison de leur profil lipidique significativement différent par rapport aux humains. Par conséquent, la manipulation génétique de leur métabolisme lipidique est obligatoire³⁴⁹. Chez la souris, la majeure partie du cholestérol est transportée dans des particules semblables à des HDL. En conséquence, les souris ne contiennent que des faibles concentrations de LDL athérogènes et de VLDL. Les souris *Ldlr*^{-/-} développent des taux plasmatiques de cholestérol significativement plus élevés. L'apolipoprotéine E (ApoE) est une glycoprotéine qui fonctionne comme un ligand pour les récepteurs qui éliminent les chylomicrons et les restes de VLDL³⁵⁰. Une déficience en ApoE conduit à une augmentation des taux plasmatiques de cholestérol total, principalement dans les fractions VLDL et chylomicrons, qui sont quadruplés par un régime riche en gras. Les deux modèles murins ont été largement utilisés pour étudier les mécanismes sous-jacents à l'initiation et à la progression de l'athérosclérose. Les lésions athérosclérotiques chez la souris se développent dans des régions du système vasculaire soumises à une contrainte de cisaillement faible³⁵¹. Les sites de prédilection chez la souris sont la racine aortique, l'arche aortique, les points de ramification des artères brachio-céphalique et carotide gauche. Cependant, avec un régime riche en cholestérol les souris *ApoE*^{-/-} développent des plaques plus rapidement et avec un phénotype plus avancé que les souris *Ldlr*^{-/-351}, c'est la raison pour laquelle notre choix d'étude expérimentale s'est porté sur le modèle *ApoE*^{-/-}.

1. Modèle d'étude : souris *ApoE*^{-/-}

Comme déjà mentionné, l'ApoE est une glycoprotéine d'une masse moléculaire d'environ 34 kDa. Elle est synthétisée principalement dans le foie et le cerveau, où elle est une composante structurale de toutes les particules de lipoprotéines à l'exception des LDL. Elle sert de ligand pour les récepteurs des lipoprotéines dont la fonction est d'éliminer les chylomicrons et les restes de VLDL. Elle est également synthétisée par les monocytes et les macrophages. D'autres fonctions comprennent l'homéostasie du cholestérol, la redistribution locale du cholestérol dans les tissus, l'immunorégulation ainsi que l'absorption alimentaire et l'excrétion biliaire du cholestérol^{352,353}

En 1992, la première lignée de souris ApoE^{-/-} a été développée presque simultanément dans deux laboratoires^{354,351}. Cependant, leur profil lipoprotéique a révélé des différences significatives avec les souris de type sauvage. La capacité des souris ApoE^{-/-} à éliminer les lipoprotéines plasmatiques est fortement diminuée, ce qui entraîne des taux de cholestérol plasmatique de 4 à 6 g/L sous un régime normal, alors que les souris sauvages ont des taux de 0,75 à 1,1 g/L³⁵⁵. Il est à noter que les taux de cholestérol plasmatique chez la souris ne sont pas affectés par l'âge ou le sexe de l'animal³⁵⁵.

L'ensemble du spectre des lésions athéroscléreuses est présent chez les souris ApoE^{-/-}³⁵⁶. L'attachement des monocytes aux cellules endothéliales est remarqué à partir de l'âge de 6 semaines, puis, après 8 semaines, le développement dans la lésion des cellules spumeuses est détectable. Après 15 à 20 semaines, des lésions intermédiaires sont présentes, contenant principalement des CML ainsi que des plaques fibreuses constituées de CML, d'une matrice extracellulaire et d'un noyau nécrotique recouvert d'une chape fibreuse³⁵⁵. Dans les lésions plus avancées, les nodules fibro-graisseux sont un site de calcification et les plaques deviennent plus calcifiées avec le temps²⁶⁵.

Les événements séquentiels de formation des plaques chez les souris ApoE^{-/-} sont similaires à ceux des modèles animaux plus grands bien établis d'athérosclérose et chez l'homme³⁵⁵. Bien que ce modèle de souris soit utilisé par de nombreux groupes de recherche, il présente certaines limites. Par exemple, l'ApoE est une protéine multifonctionnelle qui a un impact sur l'inflammation, l'oxydation, le transport inverse du cholestérol par les macrophages et la prolifération et la migration des CML. Ces fonctions pourraient affecter le développement de la plaque athéroscléreuse chez les souris ApoE^{-/-}, indépendamment des taux de lipides plasmatiques³⁵⁷. De plus, la principale limitation des modèles murins classiques d'athérosclérose est la rareté de la rupture de la plaque et de la thrombose³⁵⁸, alors que ces événements sont assez fréquents chez l'homme et peuvent conduire à un infarctus du myocarde et un accident vasculaire cérébral³⁵⁶. Il a été suggéré que cela pourrait être dû au petit diamètre des vaisseaux de la souris, à mesure que le diamètre du vaisseau diminue, la tension superficielle augmente de façon exponentielle, ce qui réduit la probabilité de rupture de la plaque³⁵⁶.

Chapitre 5 : Objectifs de la thèse

Les calcifications vasculaires jouent un rôle central dans la plaque athéroscléreuse. Cependant, leur impact sur la progression et la stabilité de la plaque reste controversé.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, les calcifications intimes sont d'un grand intérêt au cours de la progression et la stabilité de l'athérosclérose en raison de leurs hétérogénéités morphologique et fonctionnelle.

La stabilité de la plaque athéroscléreuse est probablement marquée par l'accumulation des macrocalcifications, alors que la progression de la plaque athéroscléreuse est notamment marquée par la formation des microcalcifications qui favorisent sa rupture, un élément caractéristique des plaques instables.

La phosphatase alcaline non spécifique du tissu est la seule enzyme nécessaire à la minéralisation osseuse via l'hydrolyse du PPI. La simple surexpression de la TNAP chez la souris suffit à induire des calcifications vasculaires. Ces données nous ont incités à rechercher l'implication de cette enzyme dans la formation des microcalcifications dans le contexte pathologique de l'athérosclérose.

En utilisant un modèle d'étude in vitro de cellules musculaires lisses vasculaires, le laboratoire a montré dans une étude précédente que le facteur pro-inflammatoire TNF- α stimule la TNAP dans ces cellules, ce qui suffit à induire des microcalcifications. Ces dernières à leur tour stimulent l'expression du facteur ostéogénique BMP-2 ainsi que la différenciation chondrocytaire.

Aujourd'hui aucun inhibiteur de calcification n'est utilisable in vivo. Le développement récent d'un inhibiteur efficace de la TNAP pourrait résoudre potentiellement ce problème.

Sur la base de ce qui précède, notre travail s'est articulé autour de plusieurs objectifs dans le but de valider l'hypothèse émise :

***in-vivo*, dans un modèle murin de souris ApoE^{-/-}, la TNAP est impliquée dans le processus de calcifications athéroscléreuses.**

1. Déterminer précisément quand apparaissent les microcalcifications, l'inflammation et la TNAP.
2. Déterminer les effets d'un inhibiteur de la TNAP récemment développé sur les microcalcifications et le développement des plaques.

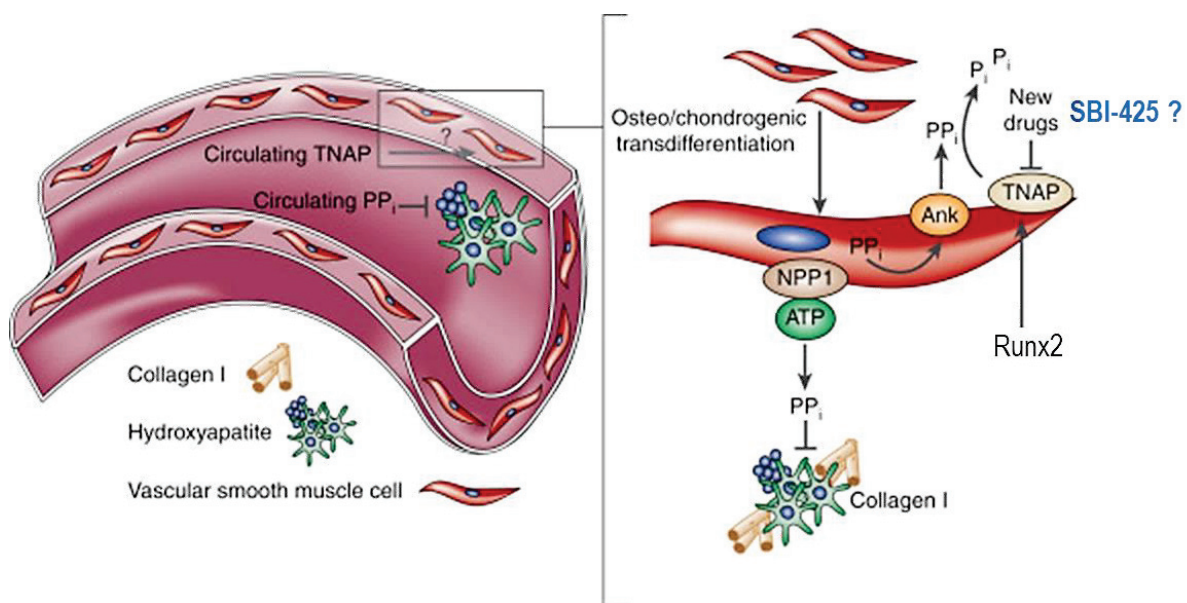


Figure 39 : Mécanisme possible de la calcification vasculaire induite par la TNAP. Les phosphatases alcalines sont des ectoenzymes ancrées à la membrane qui catalysent l'hydrolyse du PP_i, petites molécules constituées de deux ions phosphates liés par une liaison ester qui se lient aux cristaux d'hydroxyapatites naissants et empêchent l'incorporation ultérieure d'ions phosphate inorganique (Pi) dans ces cristaux. La TNAP peut être induite par le facteur de transcription Runx2 qui induit une transdifférenciation ostéochondrocytaire des CML. Le PP_i est libéré par les CML via ANK. L'enzyme NPP1 peut générer du PP_i via l'hydrolyse de l'ATP. Le dépôt minéral peut être également inhibé par PP_i. Le collagène de type I, un cofacteur de la minéralisation tissulaire dans la formation osseuse, peut également jouer un rôle dans la calcification vasculaire. SBI-425, inhibiteur récemment développé pour cibler pharmacologiquement la TNAP.

A thick dark blue vertical line runs down the left side of the page. To its right, several thin, light blue lines curve upwards and outwards, creating an abstract, grass-like or brush-like effect.

Matériel et Méthodes

1. Approches expérimentales

1.1. Caractérisation *in-vivo* et *ex-vivo* des calcifications athéroscléreuses

Tous les protocoles mis en place ont été validés par les Comités d’Ethiques pour l’Expérimentation Animale (CEEA du Rhône Université Lyon 1 et du Cermep) sous les numéros APAFIS#15387 et APAFIS#16298. Dans la première phase, un total de 72 souris mâles déficientes en ApoE et 18 souris sauvages (contrôles, CT) âgées de 6 semaines (Charles River, Lyon, France) ont été hébergées à l’animalerie de l’INSA (Lyon, France ; Cetil #C2EA-102) et placées aléatoirement, 4 souris par cage conventionnelle. Les souris ont été maintenues sous un cycle lumière-obscurité de 12 h (7 h-19 h) et ont reçue de la nourriture (régime normal standard) et de l’eau à volonté. À partir de 10 semaines, elles ont été nourries à volonté avec un régime riche en gras (HFD, D12108C, Research Diets, New-Brunswick, USA) contenant 40 % de graisses (kcal) et 1,25 % de cholestérol (p/p). Elles ont ensuite été séparées en deux cohortes pour des analyses *in-vivo* et *ex-vivo* (Fig.40, A). Le poids corporel de chaque souris a été mesuré chaque semaine après l’introduction du régime riche en gras.

Dans la cohorte 1, 8 souris ApoE^{-/-} et 2 souris CT ont été sacrifiées toutes les 2 semaines entre 17 et 31 semaines pour des analyses histologiques et moléculaires. Les sacrifices ont été réalisés après anesthésie à l’isoflurane par ponction sanguine intracardiaque puis inhalation de CO₂.

Nous avons utilisé les souris de la cohorte 2 pour visualiser les calcifications de l’aorte par ¹⁸F-NaF μTEP/μCT et comparer les données *in-vivo* avec les résultats *ex-vivo* obtenus dans la cohorte 1. Les animaux ont été transférés à l’animalerie de la plateforme d’imagerie Cermep (Lyon/Bron, France) une semaine avant les premières acquisitions.

A

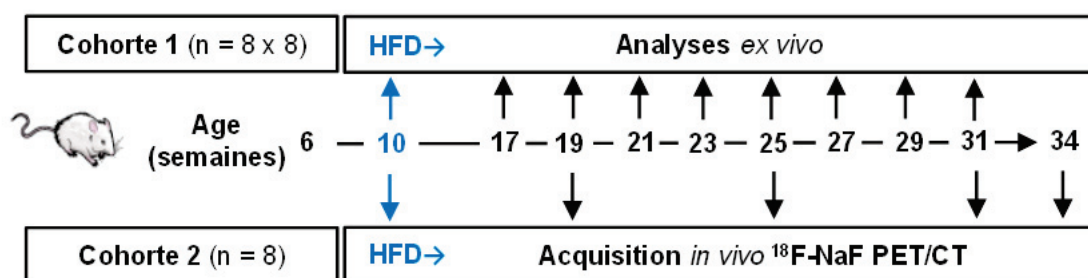


Figure 40, A : Approches expérimentales *in-vivo* et *ex-vivo*. Souris ApoE^{-/-} âgées de 6 semaines nourries avec un régime riche en gras à partir de 10 semaines, analysées *ex-vivo* toutes les deux semaines après sacrifices (cohorte 1) et *in-vivo* à 19, 25, 31 et 34 semaines (cohorte 2).

1.2. Caractérisation *in-vivo* et *ex-vivo* de l'implication de la TNAP dans les calcifications athéroscléreuses

Les effets de l'inhibition de la TNAP sur les calcifications vasculaires sont recherchés dans les cohortes 3 et 4. Dans cette deuxième phase, un total de 52 souris mâles déficientes en ApoE âgées de 6 semaines (Charles River, Lyon, France) ont été hébergées à l'animalerie de l'INSA (Lyon, France; Cetil #C2EA-102). Nous avons administré l'inhibiteur de la TNAP (SBI-425)³⁵⁹ de manière préventive à partir de 10 semaines, à raison d'environ 30 mg/kg/jour, le SBI-425 étant directement incorporé dans la nourriture (HFD comme précédemment). A la semaine 24, les souris ont ensuite été séparées en deux cohortes pour des analyses *in-vivo* et *ex-vivo* (Fig.40, B). Le traitement a été arrêté à 25 semaines ou 31 semaines. Le poids corporel de chaque souris a été mesuré chaque semaine après l'introduction du régime riche en gras.

Les souris de la cohorte 3 (2 groupes de 13 souris chacun) ont été utilisées pour l'analyse *ex-vivo*. Les souris de la cohorte 4 (2 groupes de 13 souris chacun) ont été utilisées pour l'analyse longitudinale *in-vivo* des calcifications et une analyse *ex-vivo* finale.

B

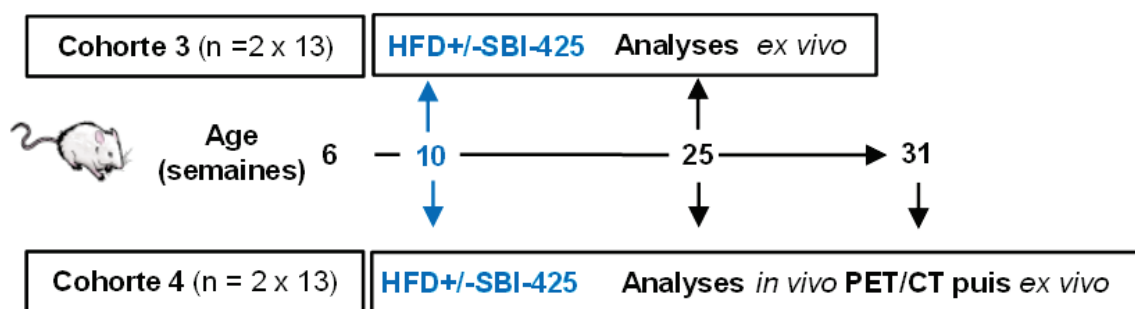


Figure 40, B: Approches expérimentales *ex-vivo* et *in-vivo*. Souris ApoE^{-/-} âgées de 6 semaines nourries avec le SBI-425 incorporé dans la nourriture (HFD) à partir de 10 semaines, analysées *ex-vivo* après sacrifice à 25 semaines (cohorte 3) et *in-vivo* et *ex-vivo* après sacrifices à 25 et 31 semaines (cohorte 4). A noter que 2 séances d'imagerie ont été annulées en raison de la pandémie de covid-19.

2. Dissection des tissus

Après exsanguination et euthanasie, une incision est réalisée dans l'oreillette droite puis le cœur et le système vasculaire sont perfusés par une solution de NaCl 0,9 % afin d'éliminer le sang. La racine aortique, l'arche aortique et la carotide sont disséquées sous microscope et incluses en « OCT » (*Optimal Cutting Temperature compound*, Thermo Scientific). Les inclusions sont conservées à -80 °C jusqu'à leur utilisation (Fig.41). L'aorte abdominale, le foie et les os sont également prélevés, rincés une fois avec du PBS et immédiatement congelés dans de l'azote liquide avant d'être placés à -80 °C jusqu'à l'extraction des ARN (Fig.2). Un

fémur et un tibia par souris sont ensuite transférés dans une solution d'éthanol 70 % pour les analyses de microarchitecture osseuse par tomographie (μ CT).

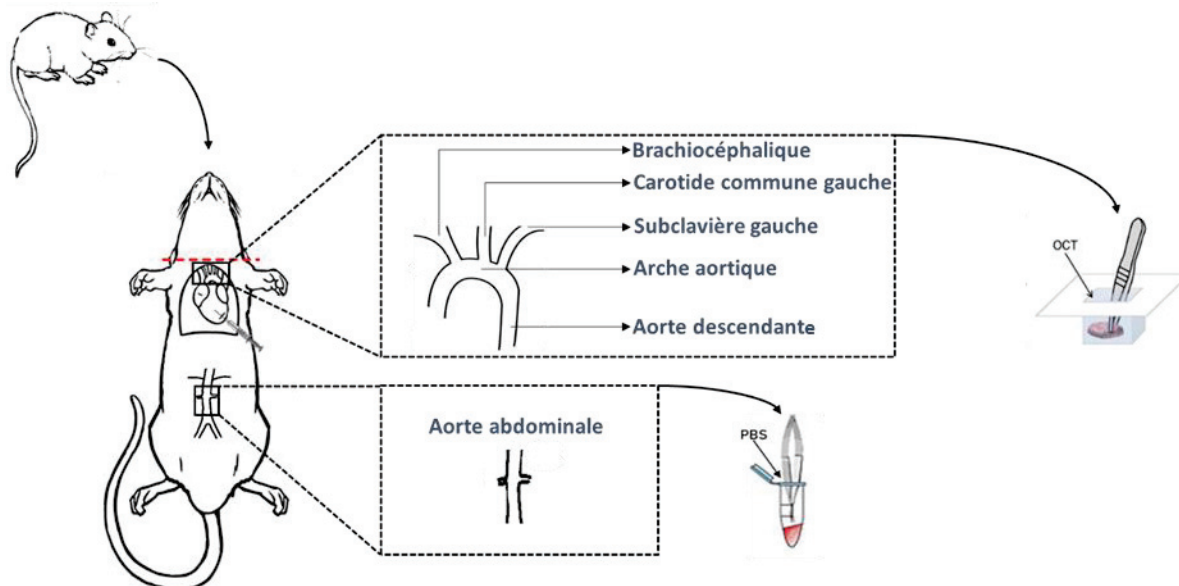


Figure 41 : Schéma représentatif de la dissection de l'arche aortique, avec ses trois ramifications (brachiocéphalique, carotide commune gauche, subclavière gauche), incluse dans l'OCT et de l'aorte abdominale, rincée dans du PBS avant congélation dans l'azote liquide.

3. Coupes de l'arche aortique

Des sections sériées de 5 μ m d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un cryostat (Cryostat Leica, CM 3050 S). La température de coupe est fixée à -20 °C. Quatre coupes sont recueillies par lames en verre (*Super Frost Plus Gold, Thermo Scientific*) et conservées à -80 °C jusqu'à l'utilisation (Fig.42).

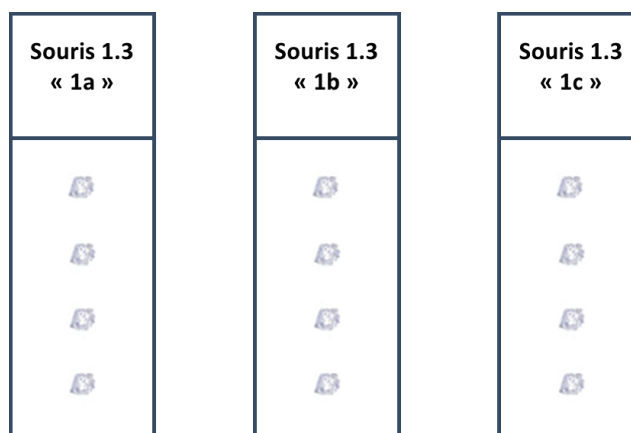


Figure 42 : Schéma représentatif des coupes sériées des arches aortiques par souris sur des lames en verre. Quatre coupes par lame.

4. Colorations histologiques

Les colorations sont réalisées sur coupes pour mettre en évidence l'activité de la TNAP en utilisant le mélange des réactifs BCIP/NBT, les calcifications en utilisant l'osteosense (OS), les glycosaminoglycanes en utilisant le bleu alcian et les gouttelettes lipidiques intracellulaires en utilisant l'oil red O.

Les échantillons congelés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sont séchés 10 minutes à température ambiante avant de commencer chaque procédure.

4.1. Coloration BCIP/NBT : détection de l'activité phosphatase alcaline

Le BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) est utilisé en association avec le NBT (nitro bleu de tétrazolium) pour la détection colorimétrique de l'activité de la TNAP.

Le BCIP est hydrolysé par la phosphatase alcaline pour former un intermédiaire bleu. L'intermédiaire est ensuite oxydé par le NBT pour produire le formazan, un dimère qui est un colorant violet intense insoluble (Fig.43).

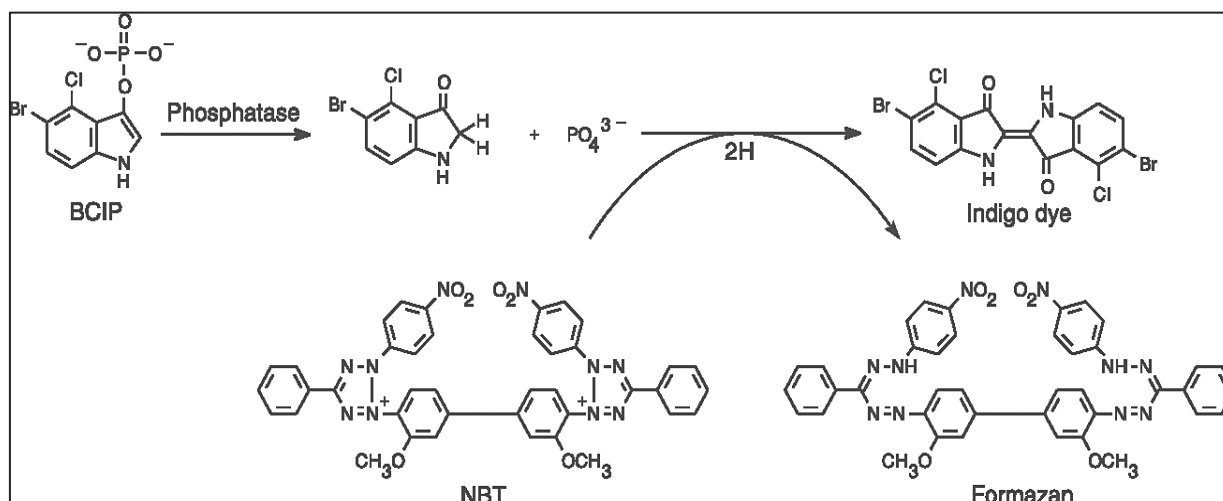


Figure 43 : Réaction entre les réactifs BCIP/NBT et la phosphatase alcaline.

Les coupes sont incubées 10 min à température ambiante à l'obscurité, en présence d'une solution de NBT/BCIP (0,44 mg/mL et 0,165 mg/mL, respectivement) dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 9,5 ; NaCl 100 mM, 5 mM MgCl_2 . Les lames sont ensuite rincées à l'eau, séchées et montées entre lame et lamelle en milieu de montage aqueux (*Immuno Histo Mount medium, Abcam*).

4.2. Coloration Osteosense (OS) : détection des calcifications

L'osteosense (OS, Perkin Elmer) est un agent d'imagerie fluorescent détectable par microscopie dans le proche infrarouge (ex/ém 650/680 nm, near infrared fluorescence, NIRF). Cet agent peut détecter l'activité ostéogénique dans le remodelage, la croissance et la résorption osseux. Récemment il a été utilisé pour détecter les dépôts de calcification dans les

artères coronaires *in-vivo* et pour détecter les microcalcifications dans l'arche aortique *ex-vivo* par liaison au site de calcification active, en particulier à l'hydroxyapatite^{8,360}.

Les coupes des arches aortiques sont incubées avec l'OS (0,13 µmol/L) toute la nuit à température ambiante, à l'obscurité. Après coloration, les lames sont rincées avec du PBS pendant 3 fois 5 min. Après rinçage, Les lames sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA 4 %) pendant 10 min puis rincées avec du PBS pendant 5 min. Finalement, les échantillons sont montés entre lame et lamelle dans un milieu de montage contenant du DAPI pour la coloration des noyaux (*Fluoromount G, Clinisciences*). Les coupes sont imagées par fluorescence dans le proche infrarouge avec un microscope confocal (LSM800, Zeiss).

4.3. Coloration Oil Red O : détection des lipides neutres

L'Oil Red O est un colorant lipophile, il diffuse vers les lipides tissulaires, et produit une coloration rouge brillant des lipides.

Les coupes sont réhydratées dans du PBS pendant 5 min, fixées avec 10 % de formaline (*Formalin 10% neutral buffered, Sigma*) pendant 5 min à température ambiante, abondamment rincées à l'eau, puis traitées avec du propylène glycol pendant 2 min. Les coupes sont ensuite colorées avec la solution d'Oil Red O (0,5% dans du propylène glycol) pendant 15 min à 60 °C et rincées à nouveau abondamment avec de l'eau. Enfin, les coupes sont contre-colorées avec une solution d'hématoxyline-éosine (solution d'hématoxyline de Mayer, Sigma), 1 min à température ambiante, permettant de colorer les noyaux en bleu et le cytoplasme en rose. Les lames sont à nouveau rincées à l'eau, séchées et montées entre lame et lamelle en milieu de montage aqueux (*Immuno Histo Mount medium, Abcam*). Les coupes sont observées et les images sont enregistrées avec un microscope Eclipse Ti E et un appareil photo digital (Nikon), combinées avec le logiciel d'imagerie (NIS Elements) (Nikon).

4.4. Coloration bleu alcian : détection des glycosaminoglycanes (GAG)

Le bleu alcian est un colorant cationique. Il forme des complexes insolubles avec les glycosaminoglycanes acides et produit une coloration bleue.

Les coupes sont fixées par incubation dans une solution d'acide acétique 3 % à pH 2,5 pendant 5 min à température ambiante puis colorées dans une solution de bleu alcian 8GX (Sigma) 1 % (p/v) dans l'acide acétique 3 % à pH 2,5 pendant 15 min à température ambiante. Les coupes sont rincées abondamment à l'eau, puis contre-colorées avec une solution d'hématoxyline-éosine (solution d'hématoxyline de Mayer, Sigma). Les lames sont rincées à l'eau, séchées et montées entre lame et lamelle en milieu de montage aqueux (*Immuno Histo Mount medium, Abcam*). Les coupes sont observées et les images sont enregistrées avec un microscope Eclipse Ti E et un appareil photo digital (Nikon), combinées avec le logiciel d'imagerie NIS Elements (Nikon).

5. Immunohistochimie : CD68

CD68 est une glycoprotéine intracellulaire, associée principalement aux granules cytoplasmiques et, dans une moindre mesure, aux membranes des macrophages.

Les coupes des arches aortiques sont fixées dans de l'acétone (-20 °C) pendant 10 min et ensuite séchées à l'air pendant 10 min, puis rincées 2 fois 5 min par une solution de Tris-HCl 0,025 M pH 7,4 NaCl/KCl 150 mM contenant 0,025 % de Triton X-100 (TBS - TX). L'activité de la peroxydase endogène est neutralisée par une solution de 0,3 % H₂O₂ pendant 10 min. Après 3 nouveaux lavages par le TBS - TX, les coupes sont incubées dans du TBS contenant 5 % de sérum (*normal goat serum*, Abcam) et 1 % de sérum albumine bovine (BSA) pour réduire la coloration non-spécifique, puis les coupes sont incubées avec un anticorps anti-CD68 (Abcam, 125212) 1 µg/mL dans du TBS contenant 1 % de BSA (TBS - BSA), pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, après 3 lavages par le TBS - TX, un anticorps secondaire polyclonal anti-immunoglobulines de lapin conjugué à la peroxydase (Abcam) dilué 1/5000^{ème} dans le TBS - BSA est appliqué pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages par le TBS - TX, la révélation est effectuée avec la 3,3'-diaminobenzidine (substrat de la peroxydase).

Les coupes sont contre-colorées avec de l'hématoxyline-éosine (solution d'hématoxyline de Mayer, Sigma). Un contrôle négatif est réalisé en appliquant la même procédure, en absence de l'anticorps primaire. Les coupes sont observées et les images sont enregistrées avec un microscope Eclipse Ti E et un appareil photo digital (Nikon), combinées avec le logiciel d'imagerie NIS Elements (Nikon).

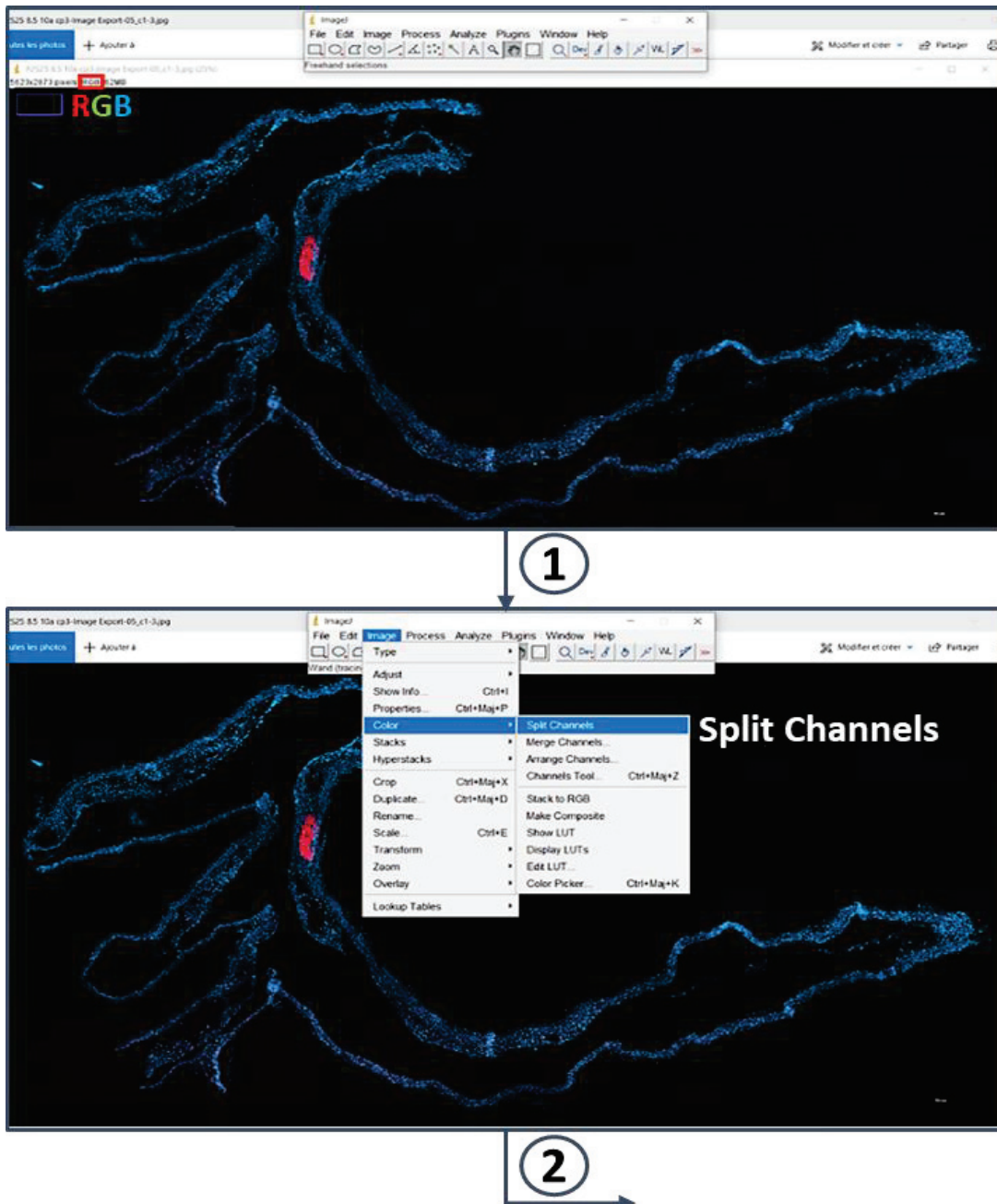
6. Analyse et traitement des images

Les analyses semi-quantitatives des échantillons d'arches aortiques sont réalisées grâce à un logiciel d'analyse d'images, « image J ». Image J est un logiciel gratuit développé aux *National Institutes of Health (NIH)* qui peut être téléchargé sur le site internet des NIH ([Download \(nih.gov\)](http://download.nih.gov)).

La première étape, avant de commencer la quantification, est de convertir les images confocales du fichier d'acquisition spécifique (czi dans Zeiss) vers un format lisible automatiquement dans image J tel que TIFF. Pour quantifier les zones de calcification dans chaque plaque athéroscléreuse, l'image *RGB (Red-Green-Blue)* est téléchargée dans image J et les canaux de couleurs multiples sont séparés en exécutant *Image-> Color-> Split Channels*. Le type de cette image est défini sur Noir et Blanc en 8 bits. Ensuite, la calibration d'image est utilisée pour convertir le nombre de pixels en unités standard en exécutant *Analyze-> Set Scale*. La barre d'échelle est mesurée par l'outil de « ligne droite » et sa longueur en pixels est marquée dans la case « *Distance in pixels* », ce qui nous permet de définir sa longueur connue en µm dans la case « *Known distance* » ainsi que de définir l'unité (µm) dans la case « *Unit of length* ». Une fois la calibration effectuée, les régions d'intérêt (zones de calcification) sont

délimitées manuellement pour mesurer la surface de calcification en exécutant *Analyse-> Set-Measurements-> Area-> Measure* (Fig.44). La moyenne de deux coupes d'arche aortique distantes d'au moins 15 μm est calculée. Le processus est répété sur chaque image. Le nombre de souris ApoE^{-/-} analysées varie entre 6 et 13 souris, selon les cohortes.

Plus d'informations sur l'utilisation d'image J sont disponibles sur [Documentation \(nih.gov\)](http://Documentation.nih.gov).



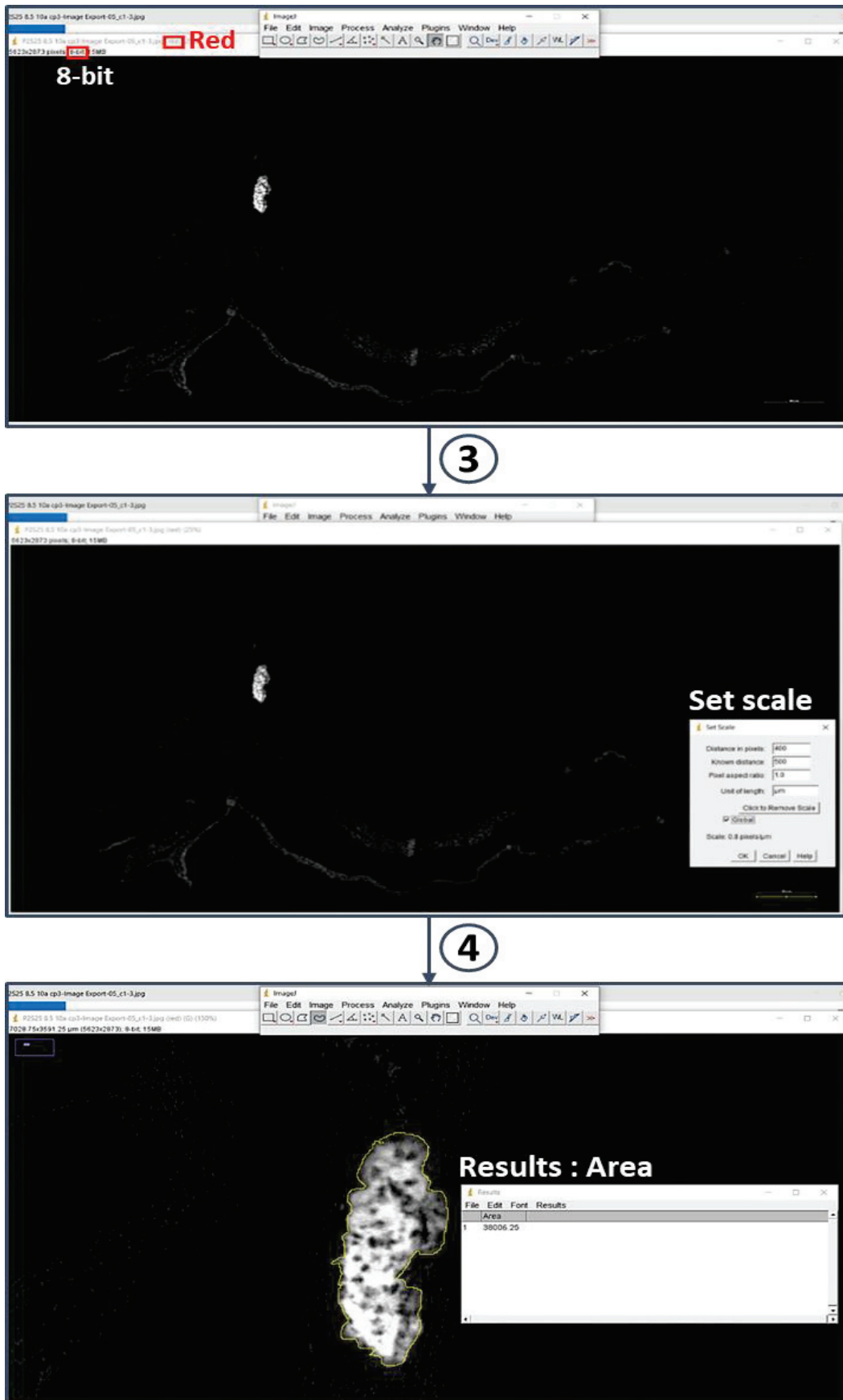


Figure 44 : Photos récapitulatives des différentes étapes réalisées par le logiciel Image J.

7. Analyse de l'expression génique

7.1. Extraction des ARN

L'extraction des ARN à partir des tissus et des cellules est réalisée grâce au kit « NucleoSpin RNA II » de Macherey-Nagel, en suivant les instructions du fabricant (fig.45). Les tissus sont réduits en poudre dans un mortier refroidi dans l'azote liquide puis sont lysés, comme les cellules, dans 350 µL de tampon riche en thiocyanate de guanidium et en présence de β-mercaptoéthanol. Le lysat est filtré sur colonne puis dilué par de l'éthanol (final 35 %) avant dépôt sur une colonne de silice, afin de favoriser les interactions avec celle-ci. L'addition d'ADNase sur la colonne pendant 15 min permet ensuite d'éliminer l'ADN contaminant. Après trois lavages, les ARN sont élués par 40 µL d'eau. La concentration en ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm, au spectrophotomètre à micro-volumes (Implen®). La pureté de l'échantillon est évaluée par le calcul des rapports des absorbances à 260 nm/280 nm et 260/230 nm.















Mini		
NucleoSpin® RNA II		
1 Homogenize sample		30 mg
2 Lyse cells		350 µL RA1 3.5 µL β-mercaptoethanol Mix
3 Filtrate lysate	 	11,000 x g, 1 min
4 Adjust RNA binding conditions		350 µL 70% ethanol Mix
5 Bind RNA	 	Load sample 11,000 x g, 30 s
6 Desalt silica membrane	 	350 µL MDB 11,000 x g, 1 min
7 Digest DNA		95 µL DNase reaction mixture RT, 15 min
8 Wash and dry silica membrane		1 st wash 200 µL RA2 2 nd wash 600 µL RA3 3 rd wash 250 µL RA3
	1 st and 2 nd 	11,000 x g, 30 s
	3 rd 	11,000 x g, 2 min
9 Elute highly pure RNA	 	60 µL RNase-free H ₂ O 11,000 x g, 1 min

Figure 45 : Schéma récapitulatif de l'extraction des ARN. (Fiche technique du fournisseur Macherey-Nagel).

7.2. Transcription inverse

La transcription inverse (RT) des ARN obtenus en ADN complémentaires (ADNc) est réalisée. Pour chaque échantillon, 1 µg d'ARN est linéarisé pendant 5 minutes à 75°C puis incubé en présence de tampon Tris-HCl 133 mM pH 8,3, KCl 199 mM, MgCl₂ 8 mM (*Invitrogen*) ; de 5 µM d'hexamères aléatoires, 0,5 mM de désoxyribonucléoside triphosphate (dNTP), 5 mM de dithiothréitol (dTTP) et de 50 U de transcriptase inverse recombinante (*Super Script II, Invitrogen*). Un contrôle négatif, sans transcriptase inverse est également réalisé. Les ARN sont transcrits en ADN complémentaire (ADNc) pendant 30 minutes à 42°C grâce à la transcriptase inverse, puis l'enzyme est inactivée à 99°C pendant 5 minutes avant un refroidissement à 20°C. Chaque échantillon est finalement dilué au 5^{ème} par ajout d'eau sans ARN/ADNases et congelés à -20°C.

7.3. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

La réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) est utilisée pour quantifier l'ADNc, donc indirectement l'ARNm, d'un échantillon. L'ADNc obtenu au cours de la transcription inverse est utilisé comme matrice lors de la réaction de PCR, réalisée grâce au kit « *iTaq Universal SYBR green Supermix* » et à l'appareil « *CFX96 Touch TM Real-Time PCR detection system* » de Biorad. Un fragment d'un gène d'intérêt est amplifié sélectivement grâce à un couple d'amorces spécifiques. La liste des amorces utilisées lors de cette thèse est rapportée dans le tableau 7. En pratique, le tampon contenant les éléments nécessaires à la réaction de PCR et le SYBR Green est mélangé avec le couple d'amorces spécifiques du gène à amplifier. Le mélange est chauffé à 95 °C pendant 30 s pour activer la Taq polymérase. Ensuite 44 cycles de PCR sont réalisés. Chaque cycle comprend 3 étapes : le mélange est maintenu à 95 °C pendant 6 s pour déshybrider l'ADN double brin en ADN simple brin ; le mélange est refroidi à 47 °C ou 60 °C (selon les amorces) pendant 15 s afin de permettre l'hybridation des amorces sur leur cible ; enfin le mélange est porté à 72 °C pendant 25 s pour permettre à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN. Les courbes d'intensité de fluorescence, correspondant à la fluorescence du *SYBR Green* lié à l'ADN double brin, en fonction du temps sont tracées et permettent de déterminer la valeur du cycle seuil « *Cp* » (*crossing point*). Ce dernier correspond au nombre de cycles nécessaires pour détecter la fluorescence.

7.4. Calcul de l'expression génique relative

Pour calculer l'expression génique des marqueurs d'intérêt dans les aortes abdominales, trois gènes de ménage différents ont été utilisés : l'actine, l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (*Hprt*) et la protéine ribosomale L13a (*Rpl13a*). La moyenne géométrique de l'expression de ces trois gènes est utilisée comme référence pour le calcul de l'expression relative.

L'expression relative est calculée selon la formule suivante :

Expression relative = $2^{-\Delta C_p}$; avec $\Delta C_p = C_p$ (gène d'intérêt) – C_p (gène de référence)

Tableau 1 : Couples d'amorces utilisées en qPCR et température d'hybridation correspondante.

Gène (murin)	Séquence de l'amorce sens (5' → 3')	Séquence de l'amorce anti-sens (5' → 3')	Température d'hybridation
Acan	GTGCGGTACCAGTGCCTGA	GGGTCTGTGCAGGTGATTCG	60
Actin	AATTCTGAATGGCCAGGT	GGTAAGGTGTGCACTTTTATTGG	60
Alpl	CAAAGGCTTCTTCTTGCTGGT	AAGGGCTTCTTGTCCGTGTC	60
Bmp2	TGGAAGTGGCCATTTAGAG	TGACGCTTTTCTCGTTTGTG	60
Cd68	ATCCCCACCTGTCTCTCA	TTGCATTTCCACAGCAGAAG	60
Col1a1	AACGAGATCGAGCTCAGAGG	GACTGTCTTGCCCCAAGTTC	60
Hprt	AGGACCTCTCGAAGTGT	ATTCAAATCCCTGAAGTACTCAT	60
IL-18	GGGCCTCAAAGGAAAGAATC	CCACTTTGCTCTTGACTTCTATC	60
IL-6	GTCACAGAAGGAGTGGCTA	AGAGAACAACATAAGTCAGATACC	60
IL-8	AAACTAATATTTATTGGG	TTTCAAGACATACAAACA	47
Opn	CTTTCCTCCAATCGTCCCTA	GCTCTCTTTGGAATGCTCAAGT	60
Runx2	GCCGGGAATGATGAGAACTA	GGACCGTCCACTGTCACTTT	60
Rpl13a	ATCCCTCCACCCTATGACAA	GCCCCAGGTAAGCAAACCTT	60
Sox9	GTACCCGCATCTGCACAAC	CTCCTCCACGAAGGGTCTCT	60
Tnf-α	TGGGACAGTGACCTGGACTGT	TTCGAAAGCCCATTGAGT	60

8. Analyses biochimiques

Le sang prélevé par ponction intracardiaque sous anesthésie gazeuse est coagulé pendant 45 min à température ambiante puis centrifugé 15 minutes à 1 500 g à 4 °C, congelé dans l'azote liquide et conservé à - 80°C avant utilisation.

8.1. Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline

Le test utilisé permet de mesurer une activité de type phosphatase en utilisant un substrat synthétique. L'activité de la TNAP est déterminée par la quantité de p-nitrophénolate (p-NP) libéré après la déphosphorylation de p-nitrophéylphosphate (p-NPP). Ce test d'activité de la phosphatase alcaline est adapté d'un protocole précédemment publié et appliqué dans une plaque de 96 puits.

Brièvement, les sérums sont mélangés avec le milieu réactionnel (2,85:1 (vol/vol)) pour obtenir les concentrations finales de 0,56 M de tampon 2-amino-2-méthyl-1-propanol pH 10,5 ; 1 mM de MgCl₂ et 10 mM de p-nitrophénylphosphate. La mesure d'absorbance est réalisée en mode cinétique à l'aide d'un spectrophotomètre-lecteur de plaque (Tecan®), toutes les 10 secondes pendant 5 min, à 405 nm et à 37 °C.

La pente de la droite qui représente l'évolution de l'absorbance en fonction du temps permet de déterminer l'activité enzymatique. L'activité spécifique est ensuite calculée, en tenant compte la concentration en protéines mesurées à l'acide bicinchoninique (BCA), en utilisant le kit « *Pierce BCA Protein Assay* » (Thermo Scientific).

8.2. Dosage du glucose

Ce dosage a pour but de mesurer le taux de glucose dans le sang. Le test est réalisé selon les recommandations du fournisseur du kit (MAK263, Sigma).

Brièvement, 50 µL de sérum (dilué 50 fois) sont déposés dans la plaque de 96 puits et incubés avec 50 µL du milieu réactionnel, contenant le tampon, les enzymes et le réactif de révélation, pendant 30 min à 37 °C, à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 570 nm (spectrophotomètre-lecteur de plaque (Tecan®)). Elle est proportionnelle à la quantité de glucose détecté dans le milieu (Fig.46).

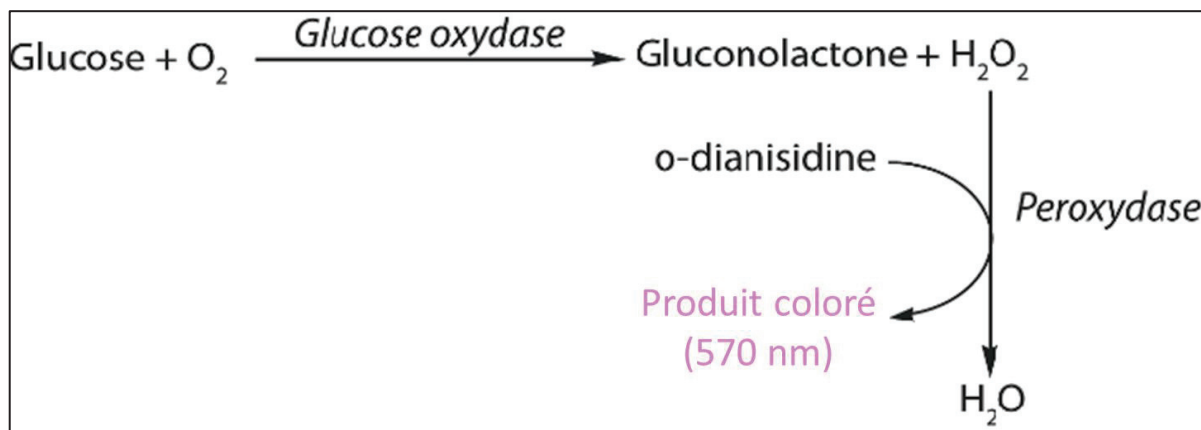


Figure 46 : Principe du dosage de glucose via deux réactions enzymatiques couplées.

9. Analyses lipidiques

9.1. Mesure de la concentration en cholestérol total

Dans ce test, la concentration de cholestérol total est déterminée par un dosage basé sur trois réactions enzymatiques couplées, qui aboutit à la formation d'un composé coloré dont l'absorbance est finalement mesurée. La concentration de cholestérol total correspond à la somme du cholestérol libre et des esters de cholestérol. Le test est réalisé selon les recommandations du fournisseur du kit de dosage (MAK043, Sigma).

Brièvement, 50 µL de sérum (dilué 150 fois) sont déposés dans la plaque de 96 puits et incubés avec 50 µL du milieu réactionnel contenant le tampon, les enzymes et le réactif de révélation, pendant 60 min à 37 °C, à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 570 nm (spectrophotomètre-lecteur de plaque (Tecan®)) (Fig.47).

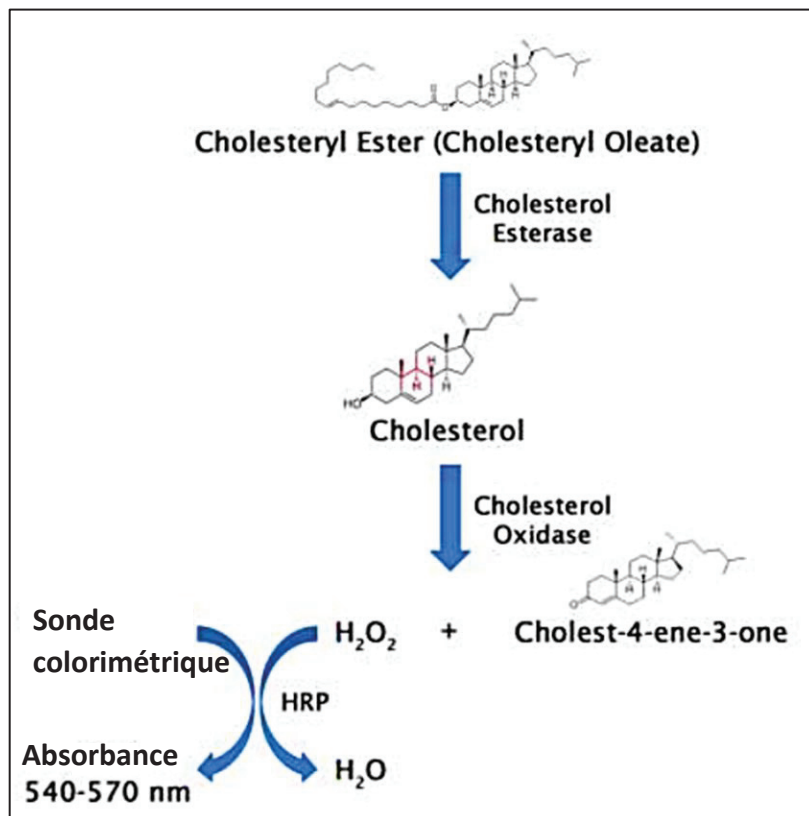


Figure 47 : Principe du dosage du cholestérol via trois réactions enzymatiques couplées.

9.2. Mesure de la concentration en triglycérides

Dans ce test, les triglycérides (TG) sont convertis en acides gras libre et glycérol. Le glycérol est ensuite oxydé afin de générer un produit fluorescent. Le test est réalisé selon les recommandations du fournisseur du kit (MAK266, Sigma).

Brièvement, 10 µL de sérum (dilué 15 fois) sont déposés dans la plaque de 96 puits et incubés avec 40 µL du milieu réactionnel contenant le tampon et la lipase. Après 20 min de réaction à température ambiante, 50 µL du milieu réactionnel contenant le tampon, les autres enzymes et le réactif de révélation sont ajoutés. Après 60 min d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, l'intensité de fluorescence est mesurée à $\lambda_{ém} = 590$ nm avec $\lambda_{ex} = 535$ nm (spectrofluorimètre-lecteur de plaque (Tecan®)) (Fig.48).

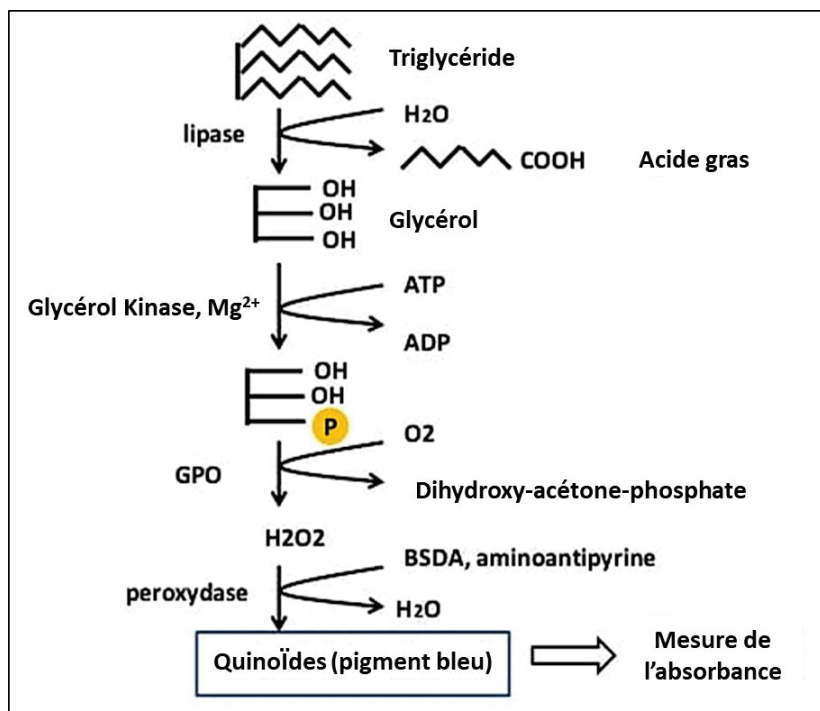


Figure 48 : Principe du dosage des triglycérides via des réactions enzymatiques couplées.

10. Analyse des molécules sécrétées par immunoessai enzymatique (ELISA)

L'immunoessai enzymatique, ou ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), est une technique qui permet de détecter les molécules sécrétées dans le milieu extracellulaire grâce à une interaction anticorps-antigène. Nous avons utilisé cette technique afin de déterminer les quantités d'interleukine IL-6 et d'haptoglobine sécrétées dans le sérum des souris ApoE^{-/-}.

10.1. Dosage d'IL-6

Dans ce test, les anticorps dirigés contre l'IL-6 murine sont greffés sur la plaque de 96 puits. Le test est réalisé selon les recommandations du fournisseur du kit de dosage (10110623, Fisher Scientific). 100 µL de sérum (dilué 2 fois) sont déposés dans la plaque de 96 puits et incubés pendant 2 h à température ambiante. Après lavage, 100 µL de solution d'anticorps secondaires spécifiques anti-IL-6, couplés à la biotine, sont déposés et incubés pendant 30 min à température ambiante. 4 lavages sont de nouveau réalisés puis 100 µL de solution de streptavidine couplée à la peroxydase sont ajoutés et incubés pendant 30 min à température ambiante. Après rinçage, 100 µL de substrat de la peroxydase, le 3,3',5,5' – tétraméthylbenzidine (TMB), sont ajoutés et incubés pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est ensuite arrêtée par acidification et l'absorbance est mesurée à 450 nm (spectrophotomètre-lecteur de plaque (Tecan®)) (Fig.49). Elle est proportionnelle à la quantité d'IL-6 détectée dans le milieu. Une gamme étalon est préparée en diluant une solution mère afin de calculer la concentration d'IL-6 sérique en pg/mL.

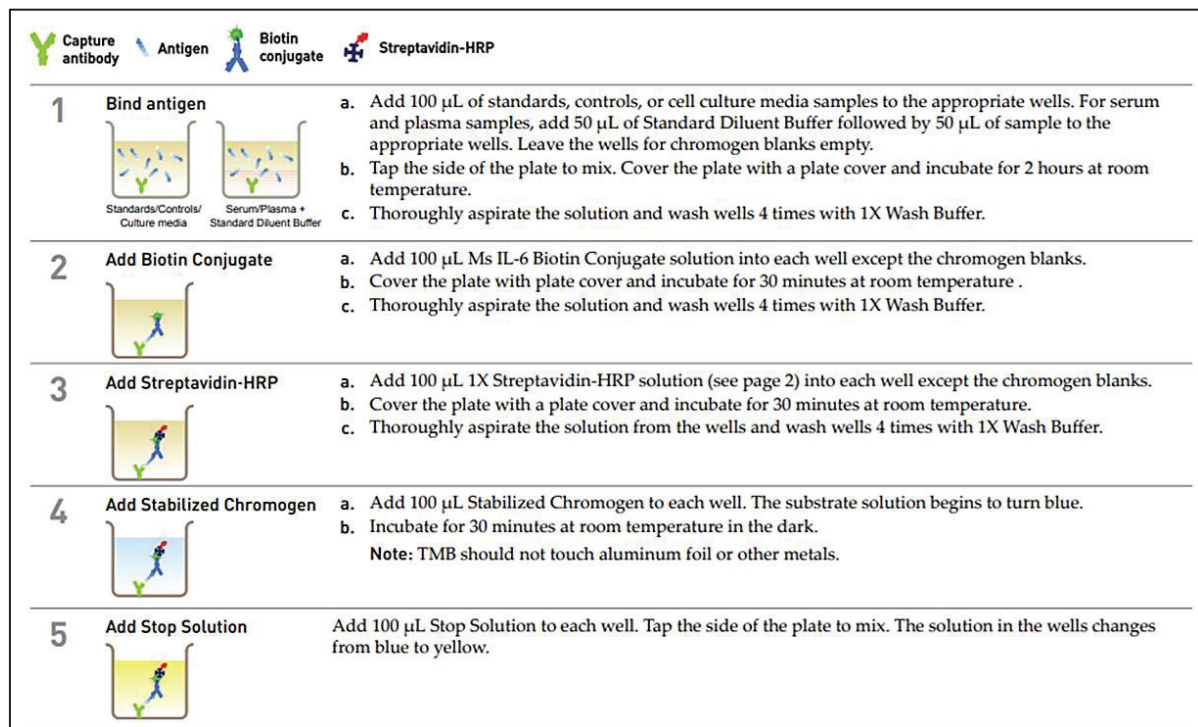


Figure 49 : Schéma récapitulatif du dosage d'IL-6. (Fiche technique de Fisher Scientific).

10.2. Dosage d'haptoglobine

Dans ce dosage, l'haptoglobine présente dans les échantillons réagit avec les anticorps anti-haptoglobine qui sont adsorbés à la surface de la plaque de 96 puits. Le test est réalisé selon les recommandations du fournisseur du kit de dosage (157714, Abcam).

100 µL de sérum (dilué 10 000 fois) sont déposés dans la plaque de 96 puits et incubés pendant 15 min à température ambiante. Après lavage, 100 µL de solution d'anticorps secondaire spécifique anti-haptoglobine conjugué à la peroxydase sont déposés et incubés pendant 15 min à température ambiante. Après rinçage, 100 µL de TMB sont ajoutés et incubés pendant 10 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Au bout de 10 min, la réaction est arrêtée par acidification et l'absorbance est mesurée à 450 nm (spectrophotomètre-lecteur de plaque (Tecan®)) (Fig.50). Elle est proportionnelle à la quantité d'haptoglobine détectée dans le milieu. Une gamme étalon est préparée en diluant une solution mère afin de calculer la concentration d'haptoglobine sérique en µg/mL.

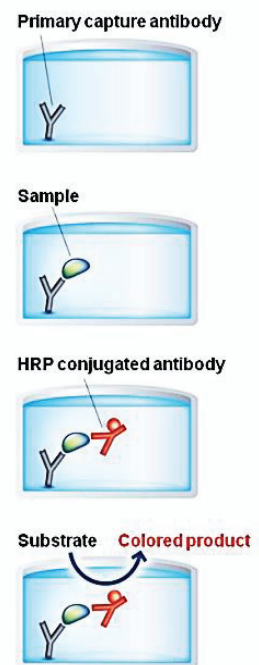


Figure 50 : Schéma récapitulatif du dosage d'haptoglobine. (Fiche technique de Abcam).

11. Culture cellulaire et traitement

11.1. Lignée cellulaire CML murine

Les cellules musculaires lisses de souris MOVAS (ATCC, Molsheim, France) sont des cellules adhérentes, caractérisées par un temps de dédoublement rapide. Les MOVAS sont cultivées dans du milieu *Dubelco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contenant de la pénicilline à 100 U/mL, de la streptomycine à 100 µg/mL (P/S), de la glutamine à 2 mM, du glucose à 4,5 g/L, de l'HEPES à 20 mmol/L et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Elles sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ en atmosphère saturée d'eau. Leur état général est régulièrement contrôlé par une observation au microscope à contraste de phase.

Avant d'atteindre la confluence les cellules sont récoltées grâce à l'action de la trypsine. Le milieu de culture est retiré, le tapis cellulaire est lavé avec du PBS puis traité avec une solution de trypsine et d'EDTA (2500-6000 U/mL et 0,2 g/L, respectivement, *Sigma*). Après une incubation d'environ 2 min à 37°C, les cellules se détachent. Les cellules ainsi remises en suspension sont ensuite diluées dans le milieu de culture, comptées sur cellule de Malassez et ensemencées dans des plaques de 6 puits à raison d'environ 2000 cellules/cm².

11.2. Traitements

Les MOVAS à confluence sont traitées au cours du temps, plus ou moins longtemps à des temps courts (2, 4 et 8 heures) et plus longs (1, 5 et 8 jours) à différentes doses (3, 30 et 300 µg/cm²) de cristaux d'hydroxyapatite (HA : Ca₅(OH)(PO₄)₃) (Fig.51). Ces cristaux d'HA sont de diamètres inférieurs à 200 nm (référence 677418, *Sigma*).

Les cristaux sont re-suspendus dans un volume convenable du milieu de culture DMEM dans des conditions stériles et incubés pendant une nuit à 37°C. Le lendemain, les cristaux sont lavés dans le même milieu de culture, puis la suspension est ajoutée sur les cellules à la densité souhaitée.

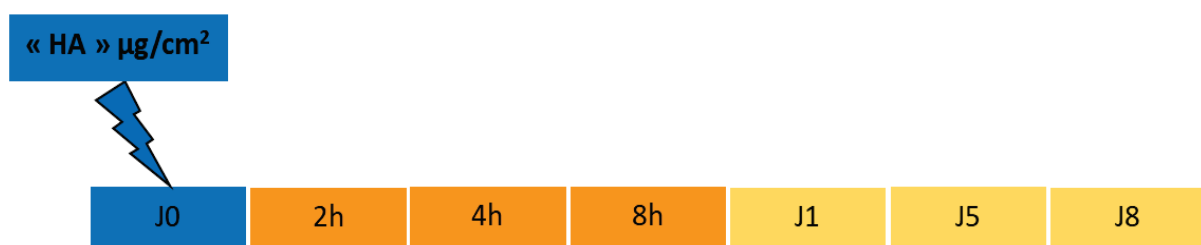


Figure 51 : Traitement des MOVAS par les cristaux d'hydroxyapatite en fonction du temps.

12. Analyses statistiques

Les résultats sont représentés sous forme de graphiques. Chaque histogramme représente la moyenne \pm l'écart-type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Past 3.20 pour les données *ex-vivo* et *in-vivo* et à l'aide du logiciel Prism (Graph pad) pour les données *in-vitro*. Les données *in-vivo* ont été testées pour la normalité et l'égalité des variances avec le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene, respectivement. Pour les données *in-vitro*, nous avons utilisé le test-t de Student et les expériences réalisées au moins 3 ou 4 fois. Les valeurs de $P < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.



Résultats

Partie A : Implication de la TNAP dans la calcification des plaques athéroscléreuses

I. Des plaques précoces lipidiques inflammatoires aux plaques tardives calcifiées avec métaplasie cartilagineuse

Dans le cadre de cette thèse, notre principale hypothèse de travail est que la TNAP est impliquée dans la calcification des plaques athéroscléreuses. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps recherché la présence de la phosphatase alcaline au cours du développement des plaques athéroscléreuses chez des souris déficientes en ApoE par rapport à des souris contrôles (CT). Parallèlement, nous avons déterminé précisément quand et comment les calcifications progressent chez ces souris. Nous avons caractérisé le développement des plaques chez des souris ApoE^{-/-} séparées en deux cohortes par comparaison aux souris contrôles. La première cohorte comprend des souris sacrifiées toutes les deux semaines pendant une durée de 17 à 31 semaines pour des analyses *ex-vivo*. La deuxième cohorte comprend des souris imagées longitudinalement à 19, 25, 31 et 34 semaines pour des analyses *in-vivo*.

1. Caractérisation du modèle murin ApoE^{-/-}

1.1. Suivi du poids corporel

Nous avons suivi le poids corporel des souris CT et des souris ApoE^{-/-} tout au long de l'étude. Les courbes de poids (Fig.52) révèlent une valeur de poids des souris ApoE^{-/-} significativement plus faible par rapport aux souris CT après 15 semaines de régime riche en gras. En effet, nous avons remarqué que les souris CT continuent à grossir normalement tandis que le poids des souris ApoE^{-/-} se stabilise après 20 semaines (Fig.52). De plus, nous avons observé que plusieurs souris ApoE^{-/-} souffrent de démangeaisons environ 4 semaines après le début du régime riche en gras ; parmi les 72 souris ApoE^{-/-}, 6 souris sont mortes entre 24 et 26 semaines.

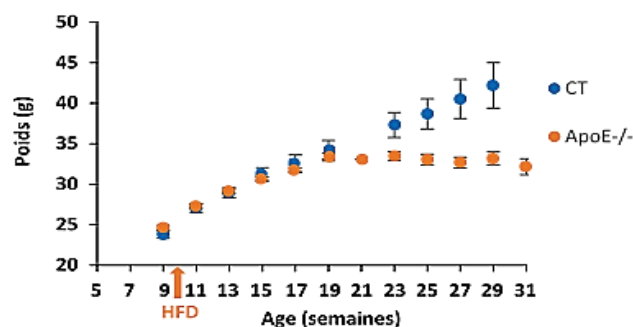


Figure 52 : Evolution du poids corporel des souris CT et ApoE^{-/-} en fonction de l'âge.

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM.

1.2. Détection des plaques

L'apparition des plaques a été recherchée sur les coupes d'arche aortique des souris CT et ApoE^{-/-}. Nous avons remarqué que chez toutes les souris ApoE^{-/-}, l'arche aortique et certaines de ses trois ramifications (brachiocéphalique, carotide commune gauche, subclavière gauche) présentent des plaques qui apparaissent à la semaine 17 et progressent au cours du temps jusqu'à la semaine 31, alors qu'aucune plaque n'est observée chez aucune des souris CT. Le nombre et l'étendue des plaques augmentent au cours du temps (Fig.53).

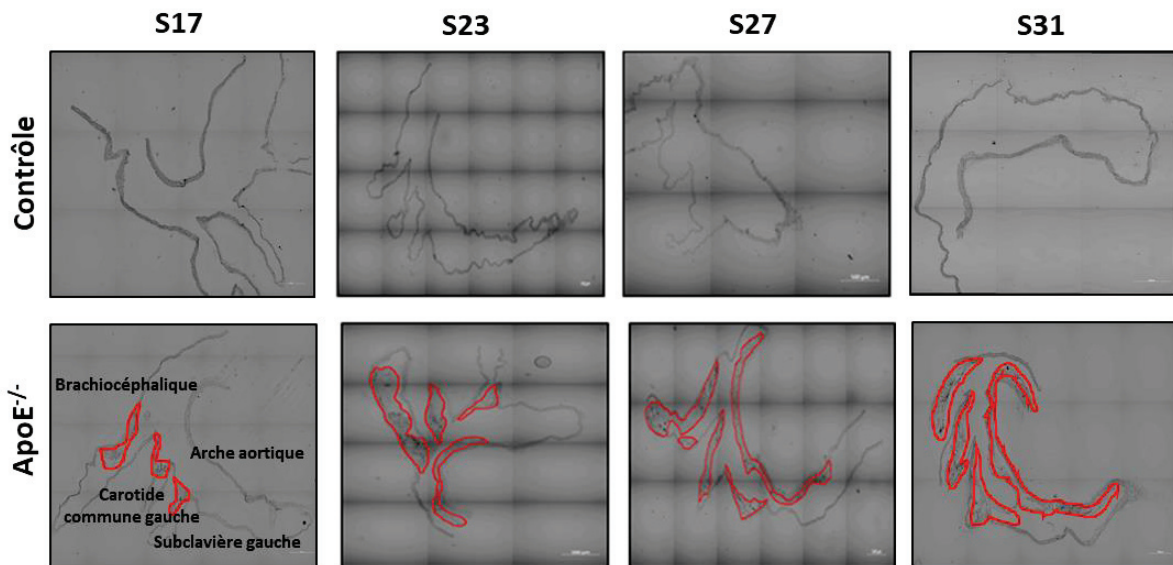


Figure 53 : Coupes histologiques montrant l'absence ou la présence des plaques dans les coupes d'arche aortique des souris CT et des souris ApoE^{-/-} de la cohorte 1 (*ex-vivo*) à 19, 21, 23 et 27 semaines. La surface des plaques est délimitée en rouge. Barre d'échelle = 500 μ m.

1.3. Détection des lipides intraplaques

Nous avons choisi l'Oil Red O comme méthode de visualisation des lipides afin de suivre l'avancement des plaques. La figure 54 montre deux images représentatives des surfaces lipidiques dans les plaques athéroscléreuses à des stades précoces (semaine 25) et tardifs (semaine 31) et permet de se rendre compte que ces surfaces sont équivalentes aux deux temps. (Fig.54). Les plaques ne sont pas forcément plus lipidiques aux âges avancés, ce qui peut suggérer une perte de cœurs lipidiques au cours du temps.

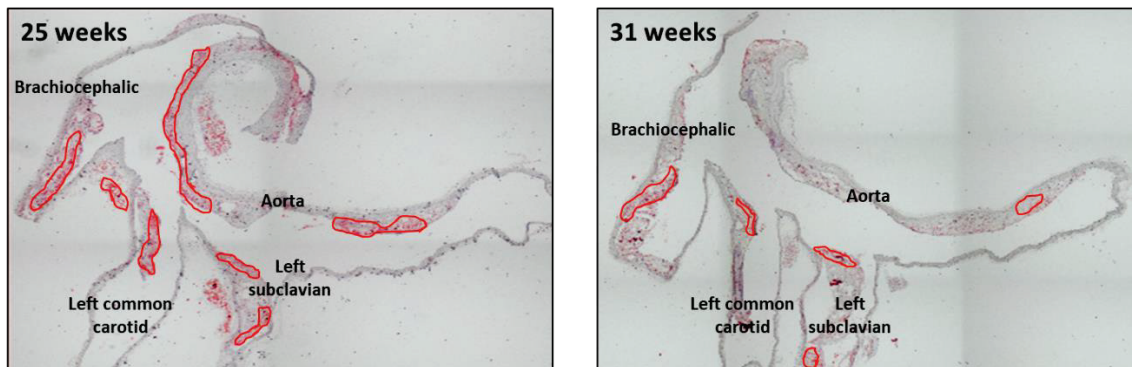


Figure 54 : Analyse histologique des lipides dans les plaques après coloration Oil Red O des coupes d'arche aortique des souris CT et des souris ApoE^{-/-} de la cohorte 1 (*ex-vivo*) à 25 et 31 semaines. Les zones positives à l'Oil Red O sont entourées en rouge.

Les résultats obtenus montrent que, conformément à la littérature, les souris ApoE^{-/-} soumises à un régime riche en gras tolèrent globalement bien ce régime, même si leur poids stagne dès la semaine 21, alors que le poids des souris CT continue à augmenter. Cette courbe de poids est très certainement liée au développement d'une réponse athérosclérotique chez les souris ApoE^{-/-}. Nous avons pu préciser que cette réponse est visible, par l'étendue des plaques et des dépôts lipidiques, dès 7 semaines après le début du régime gras et s'intensifie au cours du temps.

2. Détection *ex-vivo* des calcifications chez les souris CT et ApoE^{-/-}

Afin de détecter et de caractériser les calcifications, nous avons utilisé l'osteosense (OS) pour les coupes d'arche aortique des souris CT et des souris ApoE^{-/-}. Les calcifications sont détectées chez les souris ApoE^{-/-} à partir de 19 ou 21 semaines selon les souris, alors qu'elles sont complètement absentes chez les souris CT (Fig.55). Ces premières calcifications ayant déjà une taille d'environ 10 μm , nous utiliserons le terme « premières calcifications » au lieu de « microcalcifications » pour les qualifier. Les premières calcifications, très peu étendues, sont tout d'abord détectées dans l'arche aortique et ensuite dans d'autres artères, telles que la carotide commune gauche. Les mesures du nombre de calcifications dans les artères (Fig.56, A) montrent que ce nombre augmente plus ou moins régulièrement de la semaine 17 (0 calcification) jusqu'à la semaine 31 (entre 3 et 4 calcifications par coupe). Cette répartition met en évidence une grande hétérogénéité due à la variabilité des valeurs observées d'une souris à l'autre, celles-ci développant plus ou moins rapidement des calcifications, avec la présence d'un pic à la semaine 23, suivi d'un nombre de calcifications qui se stabilise (~ 4) entre les semaines 29 et 31 (Fig.56 et 56, A). Nous avons ensuite quantifié la surface de chacune de ces calcifications. Les résultats obtenus montrent que la surface des plaques augmente régulièrement au cours du temps, dès la semaine 19 avec apparition des premières calcifications dont la surface moyenne est de l'ordre de 8 000 μm^2 , jusqu'à la semaine 31 où elle atteint des valeurs d'environ 113 000 μm^2 (Fig.56, B).

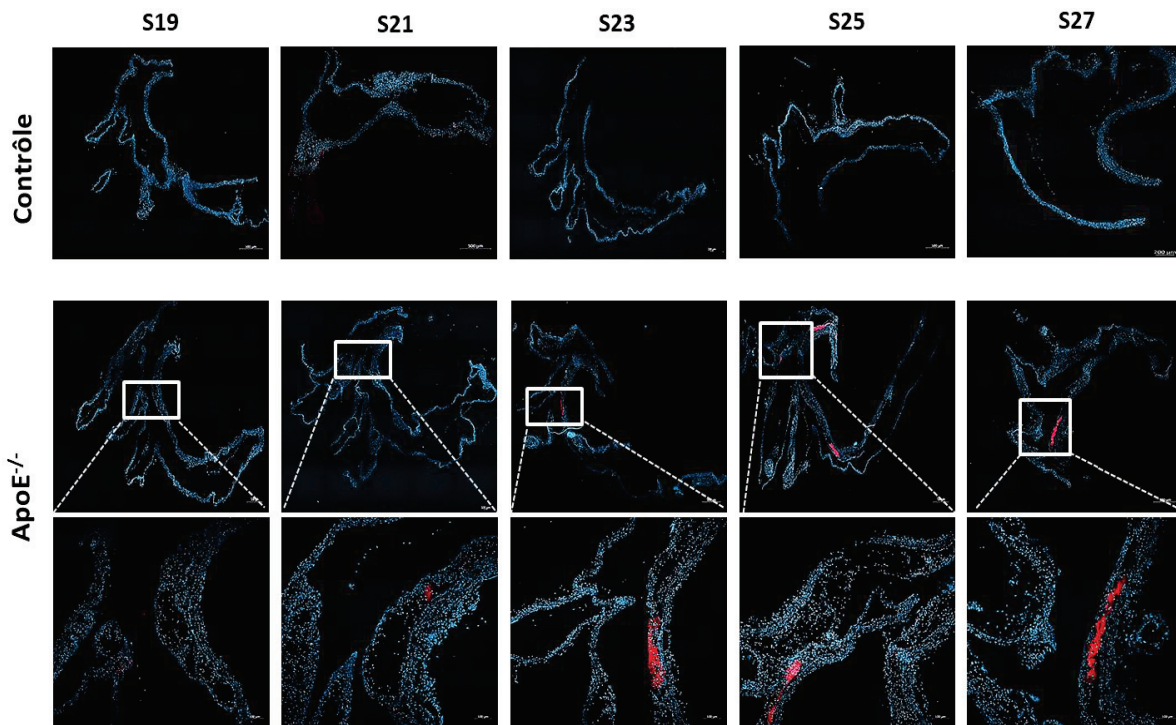


Figure 55 : Coloration histologique de la calcification après coloration OS des coupes d’arche aortique des souris CT et des souris ApoE^{-/-} de la cohorte 1 (*ex-vivo*). La zone négative à 19 semaines et les zones positives à l’OS à 21, 23, 25 et 27 semaines sont encadrées en blanc (images 2,5 x). Un plus fort grossissement de ces zones est montré au-dessous (10 x). S : semaine.

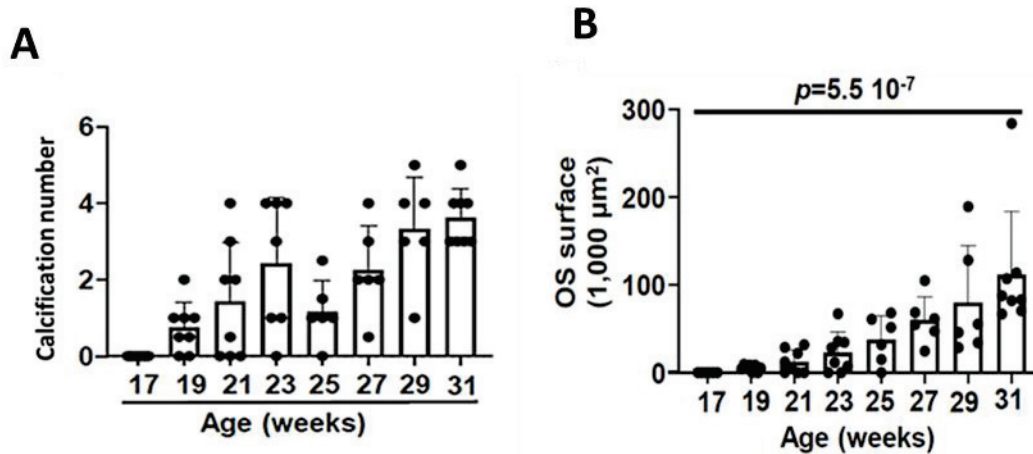


Figure 56 : (A) Quantification du nombre de calcifications (A) et de la surface moyenne des calcifications (B), après coloration OS des coupes d’arche aortique des souris ApoE^{-/-} de la cohorte 1 (*ex-vivo*) de 17 à 31 semaines (n = 8 pour S17, S19, S21, S23 et S31, n = 6 pour S25, S27 et S29). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart type. Les analyses statistiques sont réalisées à l’aide du test ANOVA univarié (B).

Ces résultats montrent que même si le nombre de calcifications n'augmente plus après la semaine 23, la surface des calcifications préexistantes continue à croître de 25 à 31 semaines. En effet de nouvelles calcifications se forment encore, au niveau soit de l'artère brachiocéphalique soit de la carotide commune gauche, mais le nombre total de calcifications reste stable car les calcifications se rejoignent et se confondent en une seule plus importante qui peut occuper toute la zone de la crosse aortique.

Le développement de l'athérosclérose chez les souris ApoE^{-/-} est donc marqué par des calcifications croissantes au cours du temps.

3. Détection *in-vivo* des calcifications chez les souris CT et ApoE^{-/-}

Parallèlement, nous avons établi une collaboration avec le centre d'imagerie (Cermep), afin de pouvoir utiliser des méthodes complémentaires pour suivre longitudinalement la calcification chez les souris ApoE^{-/-}. Dans la cohorte 2, les calcifications sont imagées par tomodensitométrie (μ CT chez le petit animal) et tomographie par émission de positons (μ TEP chez le petit animal) à 19, 25, 31 et 34 semaines.

La tomodensitométrie est un examen qui permet de quantifier les calcifications dans les plaques athéroscléreuses, alors que la tomographie par émission de positons est un examen d'imagerie multidimensionnelle qui permet de mesurer en trois dimensions les calcifications actives (en cours de formation) dans les plaques athéroscléreuses. Pour cette dernière observation, une injection intraveineuse d'un traceur faiblement radioactif, le ¹⁸F-fluorure de sodium (¹⁸F-NaF), est nécessaire. Le fluor va s'incorporer dans les cristaux d'hydroxyapatite pendant les étapes actives de la minéralisation, pour émettre de façon temporaire des rayonnements détectés et cartographiés par un tomographe à émission de positons. Comme déjà décrit dans la littérature, la ¹⁸F-NaF μ TEP s'est en effet révélée applicable aux souris ApoE^{-/-}³⁶¹ et a permis de fournir des informations complémentaires par rapport au μ CT³⁶².

Comme indiqué dans la figure Fig.57, A, les deux premières images représentent le μ TEP à 19 et 25 semaines alors que la dernière image représente le μ TEP combiné au μ CT à 34 semaines. Cette approche permet par superposition des deux modalités d'imagerie d'évaluer directement la localisation des calcifications dans l'aorte, pour de meilleures études morphologiques et localisations anatomiques. La comparaison des deux types d'images met en évidence la présence des calcifications (cercles blancs Fig.57, A) au niveau de l'arche aortique. Il reste néanmoins difficile de visualiser plus précisément chez la souris la localisation des calcifications, en partie à cause du signal important dû à l'accumulation de ¹⁸F-NaF dans le squelette axial en particulier.

Les résultats obtenus par μ CT permettent, à l'aide du logiciel INVEON research Workplace (Siemens) de calculer le volume correspondant au signal enregistré. Ces données montrent l'évolution du volume calcique dans les plaques qui devient détectable à la semaine 25, puis

s'intensifie progressivement jusqu'à la semaine 34 (Fig.57, B). Ces données suggèrent que le dépôt de calcium commence précocement et s'accumule ensuite au cours du temps. Les résultats quantitatifs obtenus par μ TEP montrent une évolution différente. La μ TEP ne détecte aucun signal du ^{18}F -NaF entre 19 et 25 semaines, puis le signal augmente de façon très importante entre 25 et 31 semaines pour finir par ne plus croître dans plus d'une souris sur 2 entre 31 et 34 semaines (Fig.57, C). Ces données suggèrent que, même si l'activité de la calcification augmente rapidement dans les stades précoces, elle ne progresse plus dans les stades tardifs bien qu'elle reste toujours présente. Par contre, le volume des calcifications augmente tout au long de l'étude, ce qui confirme logiquement la quantification histologique que nous avons obtenue précédemment concernant la surface moyenne des calcifications (Fig.56, B).

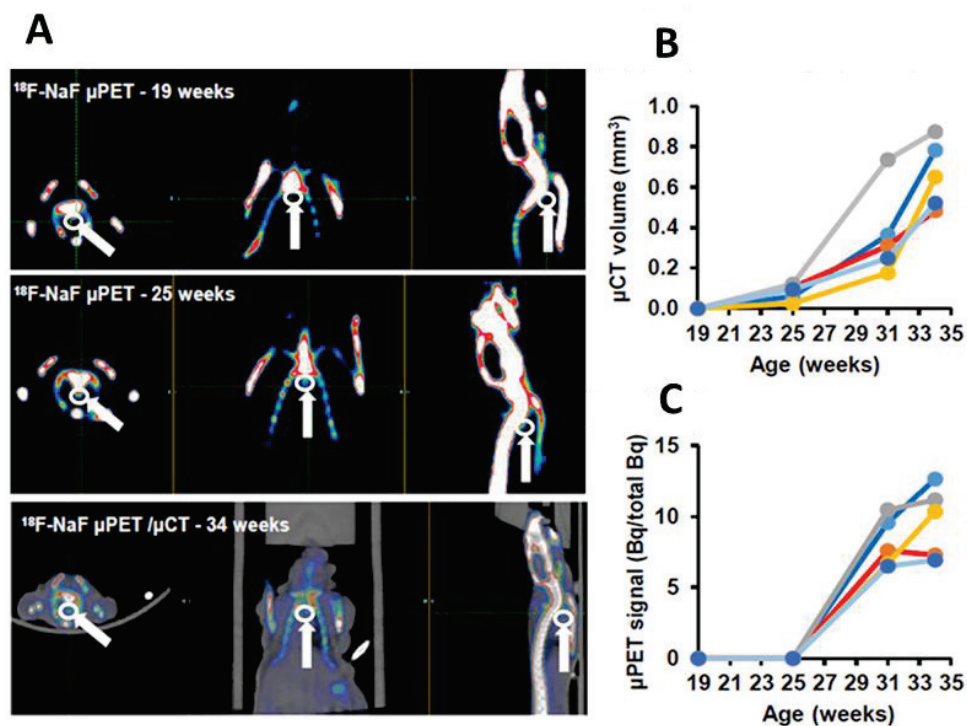


Figure 57 : (A) Imagerie in-vivo des calcifications aortiques (cercles blancs indiqués par des flèches blanches) par ^{18}F -NaF μ PET chez des souris $\text{ApoE}^{-/-}$ de 19 et 25 semaines et par ^{18}F -NaF μ PET/ μ CT chez des souris $\text{ApoE}^{-/-}$ de 34 semaines. (B) Quantification après imagerie in-vivo par μ CT (n = 5 souris indépendantes, représentées par des couleurs différentes). (C) Quantification après imagerie in-vivo par μ PET (n = 5 souris indépendantes, représentées par des couleurs différentes). CT : tomodensitométrie ; PET = TEP : tomographie par émission de positons.

4. Détection *ex-vivo* de la TNAP chez les souris CT et ApoE^{-/-}

Nous avons cherché dans un premier temps à détecter l'activité enzymatique de la TNAP dans les coupes d'arche aortique des souris CT et des souris ApoE^{-/-} par la coloration au BCIP/NBT. L'activité TNAP apparaît à la semaine 17 chez les souris ApoE^{-/-}, alors que cette activité est complètement absente chez les souris CT dépourvues de plaques. L'étendue de l'activité TNAP, qui n'est visible qu'à l'intérieur des plaques, ainsi que l'intensité de la coloration augmentent au cours du temps entre 17 et 29 semaines (Fig.58).

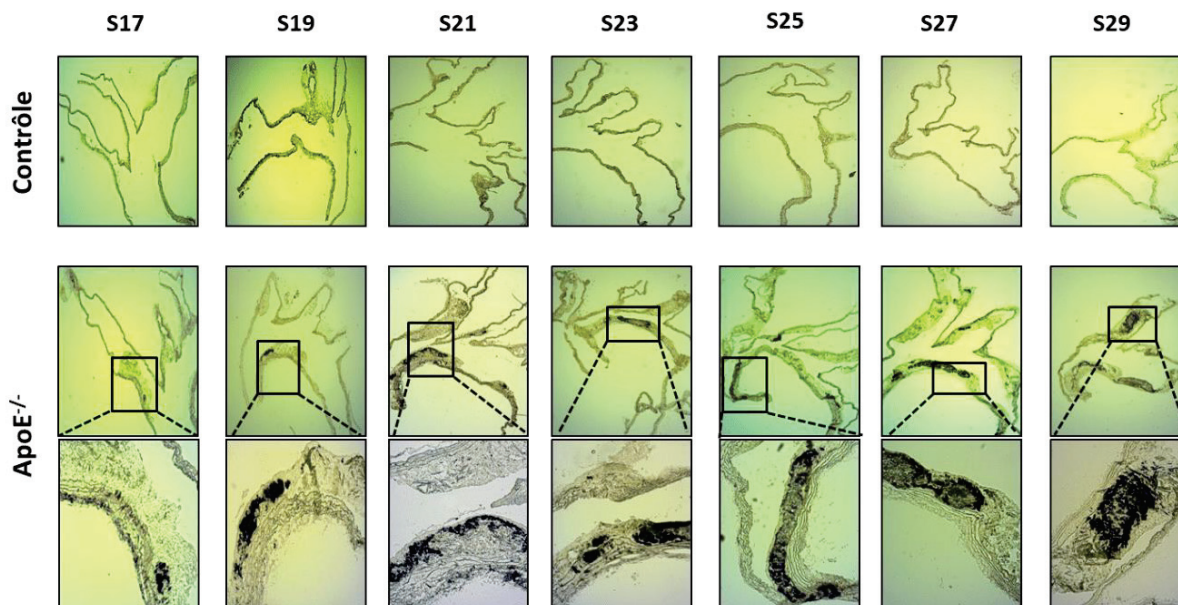


Figure 58 : Coloration histologique de l'activité TNAP dans les plaques après réaction au BCIP/NBT des coupes d'arche aortique des souris CT et des souris ApoE^{-/-} de la cohorte 1 (*ex-vivo*) de 17 à 29 semaines. Les zones positives sont encadrées en noir (images 2,5 x) et montrées à plus fort grossissement au-dessous (10 x). S : semaine.

Il est intéressant de constater que l'activité TNAP est tout d'abord détectée dans l'arche aortique, de façon très locale à la semaine 17, puis qu'ensuite, à partir de la semaine 21, de nombreuses zones d'activité positive apparaissent aussi dans les artères brachiocéphaliques et carotides, et gagent en surface au cours du temps.

5. Comparaison des localisations de la TNAP et des calcifications

Nous avons comparé les colorations de la TNAP aux colorations des calcifications avec l'osteosense. Nous pouvons remarquer que sur des coupes d'arche de souris ApoE^{-/-} âgées de 17 à 19 semaines l'activité TNAP est mise en évidence dans la partie de la crosse aortique alors qu'aucune calcification n'est détectée (Fig.59). Ces données suggèrent que, dans les plaques athéroscléroseuses, la TNAP précède les calcifications.

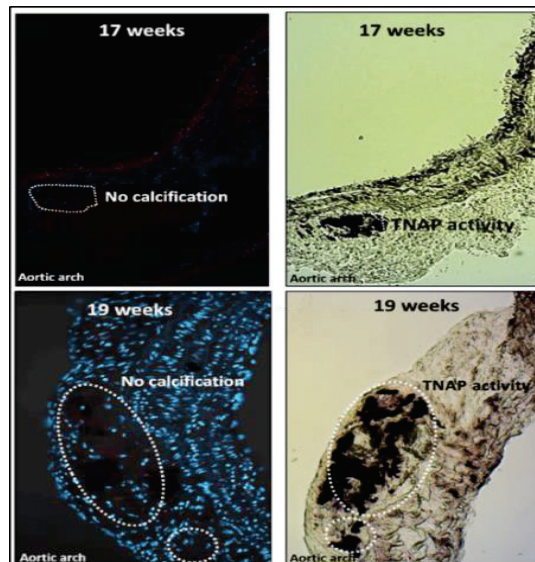


Figure 59 : Comparaison histologique des calcifications et de l'activité TNAP après coloration à l'OS (à gauche) et au BCIP/NBT (à droite) de coupes d'arche aortique des souris ApoE^{-/-} à 17 et 19 semaines. Les zones négatives à l'OS et positives au BCIP/NBT sont encerclées en blanc (images 10 x).

Nous avons aussi remarqué que lorsque les calcifications sont détectées, elles sont toujours associées à l'activité TNAP (Fig.60), que ce soit dans la crosse aortique ou dans les artères brachiocéphaliques et carotides, où elles apparaissent plus tardivement. Nous pouvons donc conclure que la TNAP apparait plus précocement que les calcifications, auxquelles elle est ensuite toujours associée dans les plaques athéroscléreuses des souris ApoE^{-/-}.

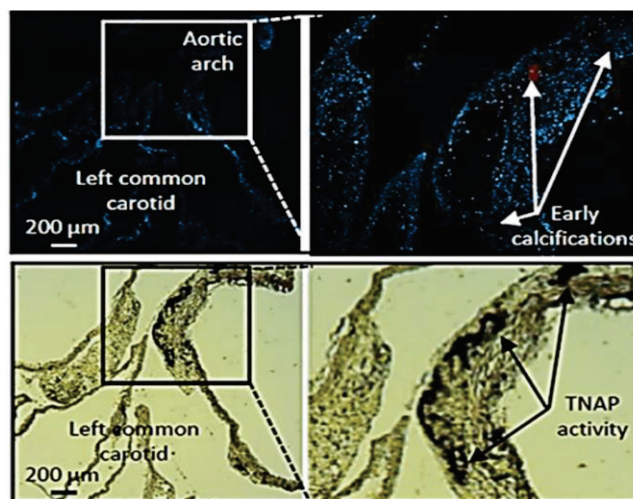


Figure 60 : Comparaison histologique des calcifications et de l'activité TNAP après coloration à l'OS (en haut) et au BCIP/NBT (en bas) des coupes d'arche aortique des souris ApoE^{-/-} à 21 semaines. Les flèches blanches et noires pointent les zones positives à l'OS et au BCIP/NBT respectivement (images 2,5 et 10 x).

Il est donc vraisemblable que la TNAP localement présente dans les tissus vasculaires de la paroi aortique soit responsable de la formation des calcifications.

6. Dosage de la TNAP sérique

Pour poursuivre l'étude du rôle de la TNAP dans la formation des calcifications, nous avons également réalisé un dosage de l'activité enzymatique de la TNAP sérique.

Nous n'avons observé aucune variation significative de l'activité TNAP dans le sérum des souris traitées et âgées de 17 à 31 semaines (Fig.61), autrement dit l'activité de la TNAP circulante reste constante au cours du temps.

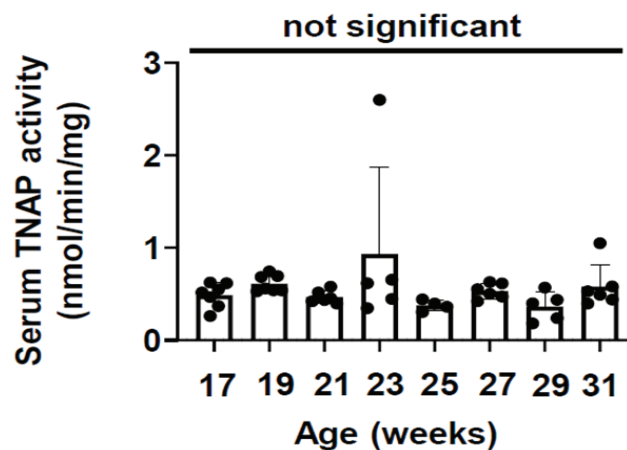


Figure 61 : Dosage de l'activité enzymatique de la TNAP sérique des souris ApoE^{-/-} entre 17 et 31 semaines. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du test ANOVA.

L'ensemble de ces données nous a permis de conclure que seule la TNAP locale contribue vraisemblablement à la calcification des plaques des souris ApoE^{-/-} et que la TNAP circulante ne semble pas impliquée.

7. Expression génique de la TNAP et de Runx2 dans les aortes abdominales

Après avoir validé la chronologie d'apparition de la TNAP et des calcifications au cours du temps dans les coupes d'arche aortique des souris ApoE^{-/-}, nous avons complété ces résultats par la mesure de l'expression génique d'*Alpl* (gène codant pour la TNAP) et de *Runx2* (facteur de transcription qui contrôle l'expression de la TNAP) dans les aortes abdominales des souris ApoE^{-/-}. L'expression génique d'*Alpl* montre une augmentation sous forme de deux pics significatifs mis en évidence aux semaines 19 et 27 (Fig.62, A). Les résultats obtenus pour *Runx2* montrent à peu près le même profil d'expression que celui de *Alpl*, un premier pic à la semaine 19 suivi d'un second pic à la semaine 27 (Fig.62, B).

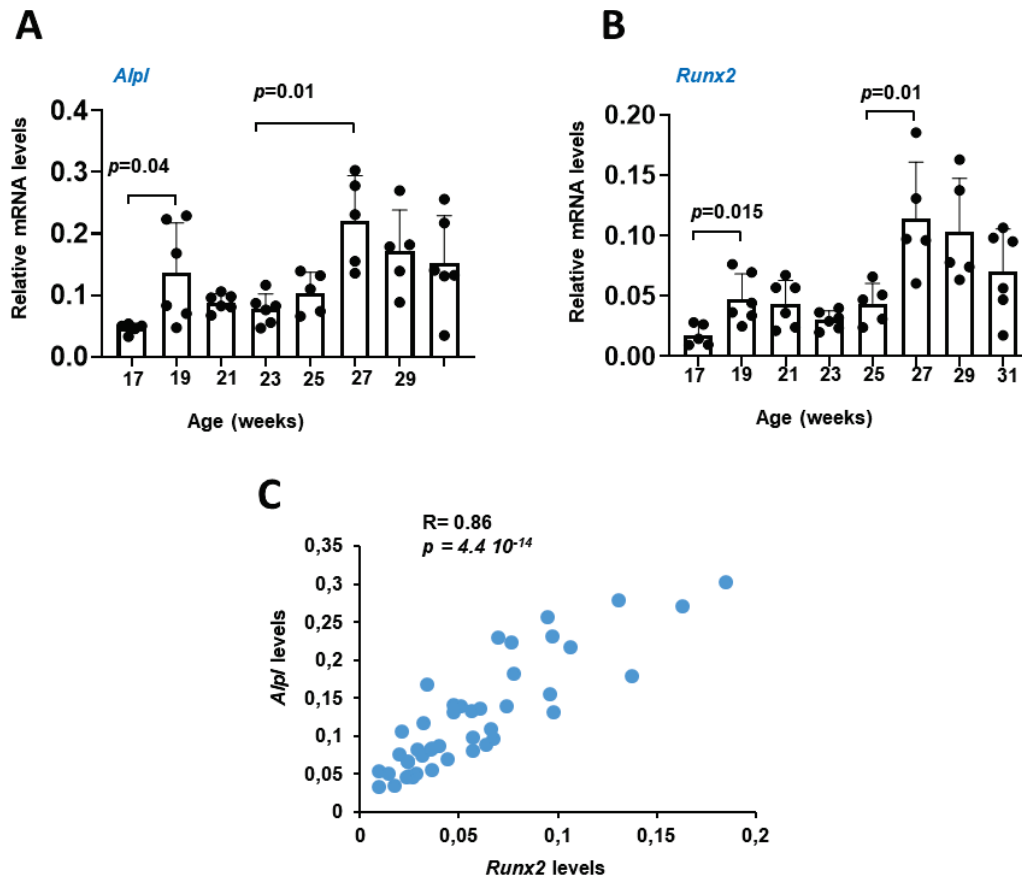


Figure 62 : Expression génique d'*Alpl* (A) et *Runx2* (B) dans l'aorte abdominale des souris *ApoE*^{-/-} [(n = 5 à S17, type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student. **Corrélation entre les niveaux d'expression d'*Alpl* et de *Runx2* de 17 à 31 semaines (C). Les corrélations sont calculées à l'aide du test de corrélation de Pearson's. S27 et S29 ; n = 6 à S19, S21, S23, S25 et S31)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart.**

Suite à la similarité dans l'expression de ces deux gènes, nous avons cherché s'il existe une corrélation entre eux. Nous avons mesuré le coefficient de corrélation (R) qui représente la relation linéaire entre ces deux variables, et calculé le niveau de significativité (p) pour chaque corrélation, puisqu'il est une information essentielle quant à la fiabilité de la corrélation étudiée.

Nous avons obtenu un coefficient de corrélation R égal à 0,86 et une valeur de p égale à $4,4 \cdot 10^{-14}$, ce qui représente une forte corrélation positive entre les niveaux d'expression de *Alpl* et ceux de *Runx2*, exprimés dès la semaine 17 jusqu'à la semaine 31 (Fig.62, C). Ces données suggèrent que la TNAP présente dans les plaques est probablement exprimée par des cellules de type ostéochondrocytaire, qui pourraient être des CML trans-différenciées.

8. Progression des calcifications *ex-vivo* et métaplasie cartilagineuse

8.1. Détection de la matrice cartilagineuse

Comme rappelé dans l'introduction bibliographique, la calcification des plaques dans le modèle de souris ApoE^{-/-} se développe grâce à un processus mimant l'ossification endochondrale²⁷⁵. Dans le but de mieux analyser l'implication de la métaplasie cartilagineuse dans la calcification des plaques chez les souris ApoE^{-/-}, nous avons utilisé le bleu alcian comme méthode de visualisation de la formation de la matrice cartilagineuse. La figure 63 présente l'étendue de la matrice cartilagineuse dans les arches aortiques des souris ApoE^{-/-}.

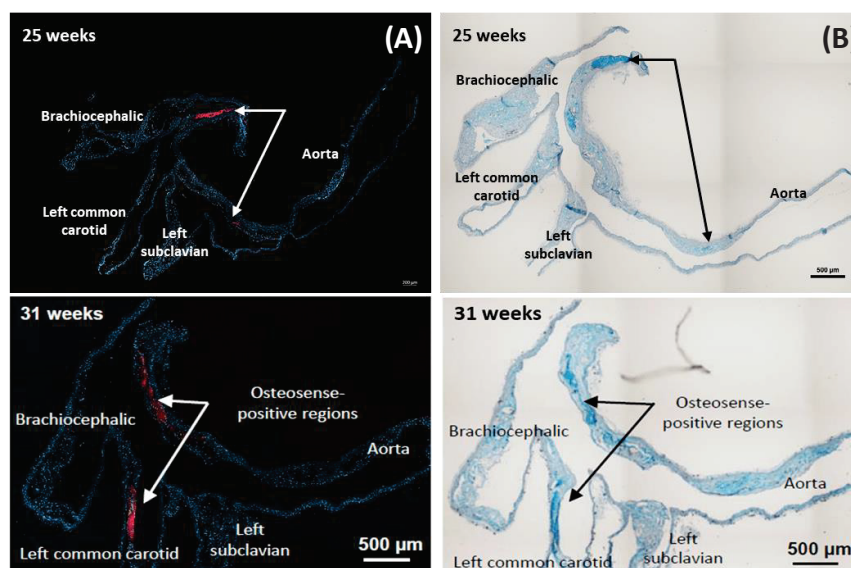


Figure 63 : Comparaison de la localisation des zones de calcification (flèches blanches, A) **et des zones cartilagineuses** colorées au bleu alcian (flèches noires, B) dans les arches aortiques des souris ApoE^{-/-} de 25 et 31 semaines.

Les zones positives au bleu alcian, correspondant à la présence de cartilage, sont logiquement plus étendues dans les stades tardifs (semaine 31) que dans les stades précoces (semaine 25). La comparaison des zones cartilagineuses avec les zones calcifiées (colorées en rouge par OS), montre que les deux sont superposées à la fois dans les stades précoces (semaine 25) et dans les stades tardifs (semaine 31) (Fig. 63). Ces analyses suggèrent que les calcifications progressent dans la métaplasie cartilagineuse.

8.2. Expression génique de *Bmp2*, *Sox9* et *Acan* dans les aortes abdominales

En vue de confirmer que les calcifications progressent effectivement dans la métaplasie cartilagineuse, nous avons mesuré par qPCR l'expression de *Bmp2* (puissant facteur ostéogénique nécessaire à la formation osseuse), *Sox9* et *Acan* (facteurs de la différenciation chondrocytaire, *Sox9* est le facteur de transcription qui contrôle *Acan*) dans les aortes abdominales des souris *ApoE*^{-/-}. Les niveaux d'expression des ARNm de ces trois facteurs montrent des profils d'expression similaires mais avec quelques petites variations. Le graphe présentant l'expression de *Bmp2* montre une augmentation globale de l'expression de ce facteur ostéogénique au cours du temps, avec un pic à la semaine 19 (détection des premières calcifications), et une augmentation significative lors des semaines 29 et 31 (Fig.64).

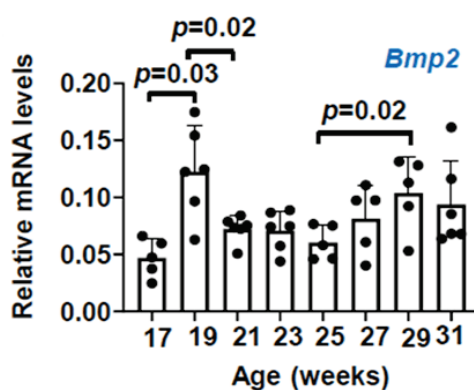


Figure 64 : Expression génique de *Bmp-2* dans l'aorte abdominale des souris *ApoE*^{-/-} (n = 5 à S17, S27 et S29 ; n = 6 à S19, S21, S23, S25 et S31). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

L'analyse de l'expression de *Acan* montre à peu près le même profil, avec une augmentation significative de l'expression à la semaine 19 suivie d'une autre entre les semaines 27 et 29 (Fig.65). Le profil d'expression de *Sox9* au cours du temps est légèrement différent puisqu'il met en évidence un seul pic centré à la semaine 29.

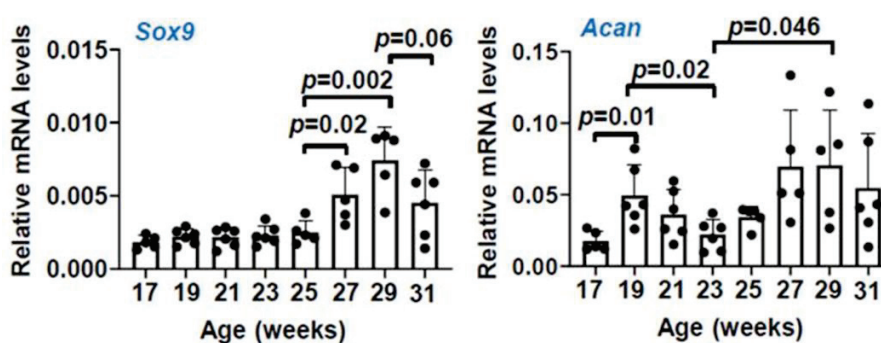


Figure 65 : Expression génique de *Sox9* et *Acan* dans l'aorte abdominale des souris *ApoE*^{-/-} [(n = 5 à S17, S27 et S29 ; n = 6 à S19, S21, S23, S25 et S31)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type. Les analyses statistiques sont faites par un test-t de Student.

L'ensemble de ces résultats nous permet de montrer que les calcifications progressent dans la métaplasie cartilagineuse en association avec l'augmentation des expressions de *Bmp2*, *Sox9* et *Acan*. Fait intéressant, le ralentissement de l'activité des calcifications à la semaine 31 mis en évidence *in-vivo* (Fig.57, C) est associé à une diminution de l'expression des marqueurs chondrocytaires après la semaine 29.

9. Progression des calcifications *ex-vivo* et plaques lipidiques

Les coupes d'arche aortique des souris *ApoE^{-/-}* ont été colorées à l'Oil Red O (Fig.54) afin de suivre exactement la localisation des lipides dans les plaques et de la comparer à la localisation des calcifications et de la matrice cartilagineuse (Fig.66).

Nous avons pu constater que, dans les stades précoces (semaine 25), les premières calcifications se développent à proximité des cœurs lipidiques alors que, dans les stades tardifs (semaine 31), elles progressent dans une métaplasie cartilagineuse (mise en évidence par coloration bleu alcian). Nous avons aussi remarqué que, lorsque l'arche aortique devient complètement calcifiée, même aux temps relativement précoces, la plaque calcifiée est entièrement cartilagineuse avec une absence totale de cœur lipidique (Fig.66). Les noyaux lipidiques diminuent avec le temps et sont probablement remplacés par des zones cartilagineuses calcifiées avancées.

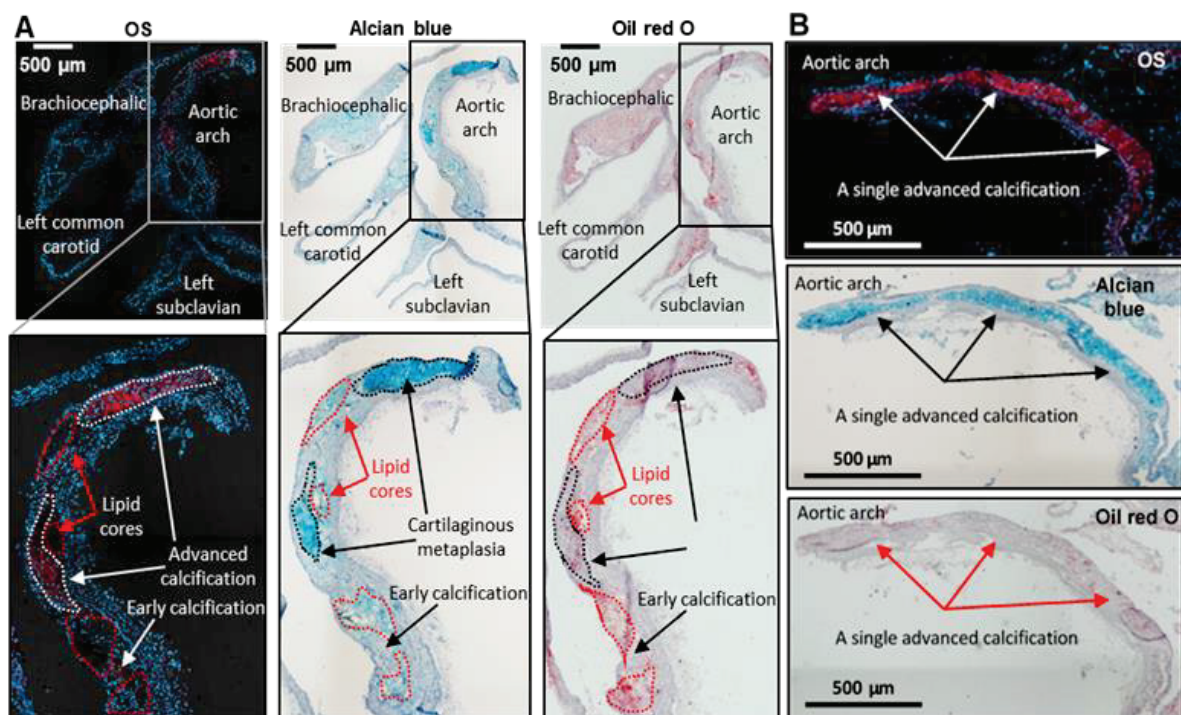


Figure 66 : Analyse histologique des calcifications après coloration OS (flèches blanches) **du cartilage** après coloration bleu alcian (flèches noires) et **des lipides** après coloration Oil Red O (flèches rouges) des coupes d'arche aortique avec des plaques partiellement (A) et totalement calcifiées (B) des souris *ApoE^{-/-}* de 25 semaines.

10. Calcifications et inflammation *ex-vivo*

10.1. Expression génique des marqueurs inflammatoires dans les aortes abdominales

Comme indiqué dans la partie introduction, il est connu que l'inflammation joue un rôle important dans l'initiation et la progression de la plaque athéroscléreuse. Afin de chercher l'implication de l'inflammation dans notre modèle d'étude, nous avons suivi par qPCR l'expression des marqueurs inflammatoires, tels qu'*Il-1 β* , *Il-6* et *Tnf- α* , dans l'aorte abdominale des souris *ApoE^{-/-}*. Les niveaux des transcrits de ces trois marqueurs montrent à peu près le même profil d'expression, à savoir une évolution sous forme de vagues. La première vague est située entre les semaines 17 à 23 avec une augmentation significative à la semaine 21. La deuxième vague a lieu entre 23 et 29 semaines avec une augmentation significative à la semaine 27 supérieure à celle de la 1^{ère} vague (Fig.67). Le premier pic, observé à la semaine 21, est compatible avec l'hypothèse que les calcifications, qui sont détectables dès la semaine 19, sont strictement corrélées à l'inflammation.

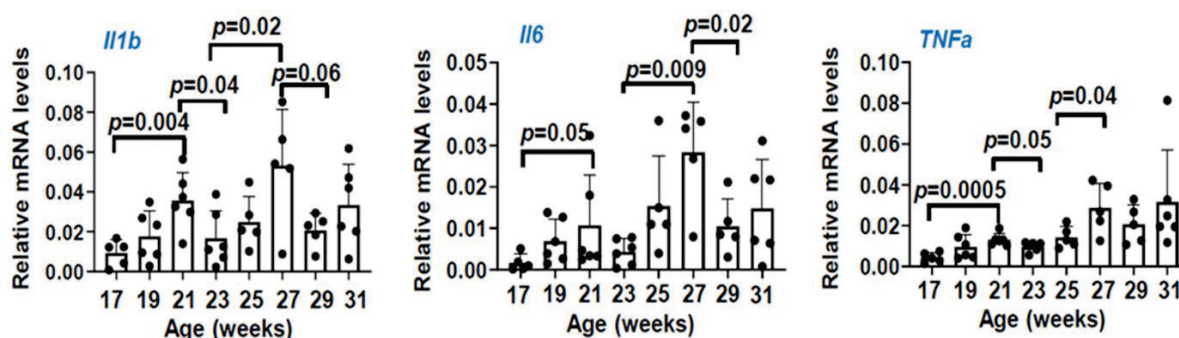


Figure 67 : Expression génique d'*Il-1 β* , *Il-6* et *Tnf- α* dans l'aorte abdominale des souris *ApoE^{-/-}* [(n = 5 à S17, S27 et S29 ; n = 6 à S19, S21, S23, S25 et S31)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

10.2. Détection des macrophages dans les plaques athéroscléreuses

Il est admis selon la littérature que les microcalcifications peuvent déstabiliser les plaques par des mécanismes pro-inflammatoires. Nous avons également réalisé la détection de CD68 qui constitue un marqueur fiable des macrophages, et qui permet donc de suivre qualitativement l'inflammation dans les plaques. Nous avons pu montrer que, dans les plaques avancées (semaine 31), les petites calcifications débutantes se trouvent dans des plaques enrichies en macrophages positifs pour CD68 (zone colorée en brun), alors que les régions cartilagineuses calcifiées avancées sont systématiquement dépourvues de macrophages (Fig.68).

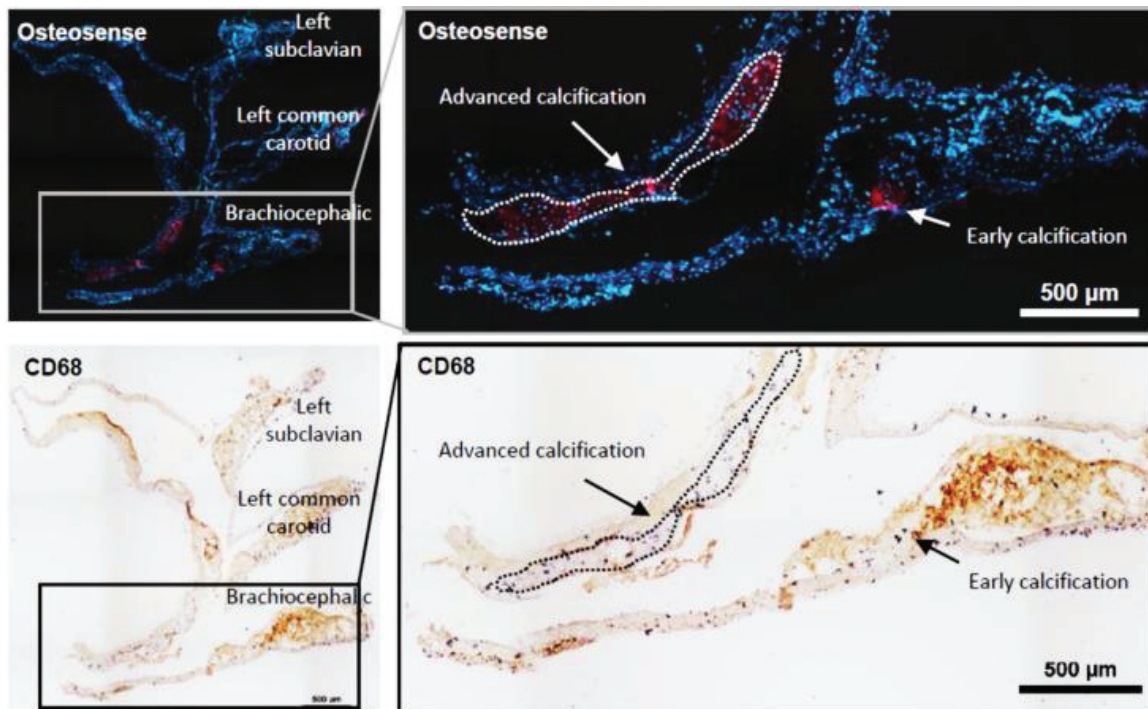


Figure 68 : Analyse histologique des calcifications précoces et tardives après coloration OS (flèches blanches, images 10 x, au-dessus), comparés aux zones inflammatoires après immunodétection de CD68 (flèches noires, images 10 x, au-dessous) dans les arches aortiques des souris ApoE^{-/-} de 31 semaines.

Ces résultats signifient que les plaques les plus calcifiées ne sont pas les plus pro-inflammatoires, ce qui suggère que l'inflammation stimule les calcifications et pas l'inverse.

11. Lien entre inflammation et différenciation ostéochondrocytaire

En nous basant sur les résultats obtenus par qPCR montrant l'expression des marqueurs pro-inflammatoires, tels qu'*Il-1 β* , *Il-6* et *Tnf- α* d'une part, et ostéochondrocytaires tels que *Runx2* et *Sox9* d'autre part, au cours du temps, nous avons cherché les relations entre l'inflammation et la trans-différenciation ostéochondrocytaire. Nous avons, comme précédemment, mesuré le coefficient de corrélation (R) et calculé le niveau de significativité (p) pour chaque corrélation.

11.1. Corrélation entre IL-1 β , Sox9 et Runx2

Les coefficients de corrélation calculés pour les semaines 17 à 21, entre les valeurs d'expression d'*Il-1 β* et *Sox9*, d'une part, et d'*Il-1 β* et *Runx2*, d'autre part, sont R = 0,52 avec p = 0,03 et R = 0,58 avec p = 0,01, respectivement (Fig.69).

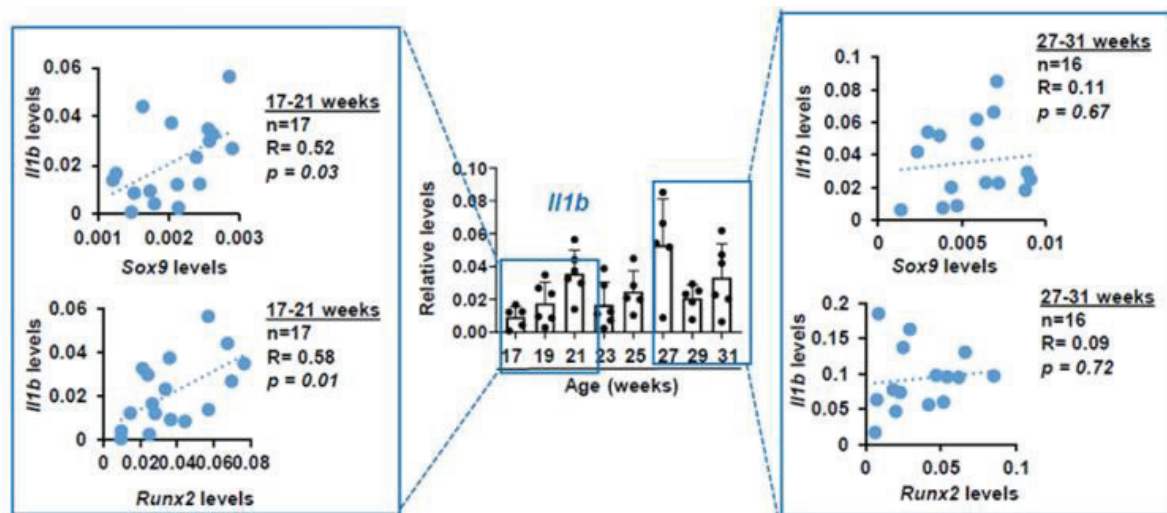


Figure 69 : Corrélations entre les niveaux d'expression d'IL-1 β et Sox9 ou Runx2 entre 17 et 21 semaines (calcifications précoces, $n = 17$ souris) et 27 et 31 semaines (calcifications avancées, $n = 16$ souris). Les corrélations sont calculées à l'aide du test de corrélation de Pearson's.

Ces données montrent une forte corrélation positive entre IL-1 β et l'un ou l'autre des marqueurs ostéochondrocytaires à des temps précoces. Les coefficients de corrélation calculés pour les semaines 27 à 31, entre les valeurs d'expression d'IL-1 β et Sox9, d'une part, et d'IL-1 β et Runx2, d'autre part, sont $R = 0,11$ avec $p = 0,67$ et $R = 0,09$ avec $p = 0,72$, respectivement. Contrairement aux résultats obtenus pour les temps précoces, ces données ne montrent pas de corrélation à des temps tardifs (Fig.69).

11.2. Corrélation entre IL-6, Sox9 et Runx2

De même, les coefficients de corrélation mesurés pour les semaines 17 à 21, entre les valeurs d'expression d'IL-6 et Sox9, d'une part, et d'IL-6 et Runx2, d'autre part, sont $R = 0,66$ avec $p = 0,004$ et $R = 0,44$ avec $p = 0,07$; respectivement. Ces données montrent une forte corrélation positive entre IL-6 et Sox9, à des temps précoces et une faible corrélation positive non-significative entre IL-6 et Runx2. Les coefficients de corrélation mesurés pour les semaines 27 à 31, entre les valeurs d'expression d'IL-6 et Sox9, d'une part, et d'IL-6 et Runx2, d'autre part, sont $R = 0,06$ avec $p = 0,82$ et $R = 0,19$ avec $p = 0,47$, respectivement. Ces dernières données montrent qu'il n'existe pas de corrélation entre ces valeurs entre ces différentes variables à des temps tardifs (Fig.70).

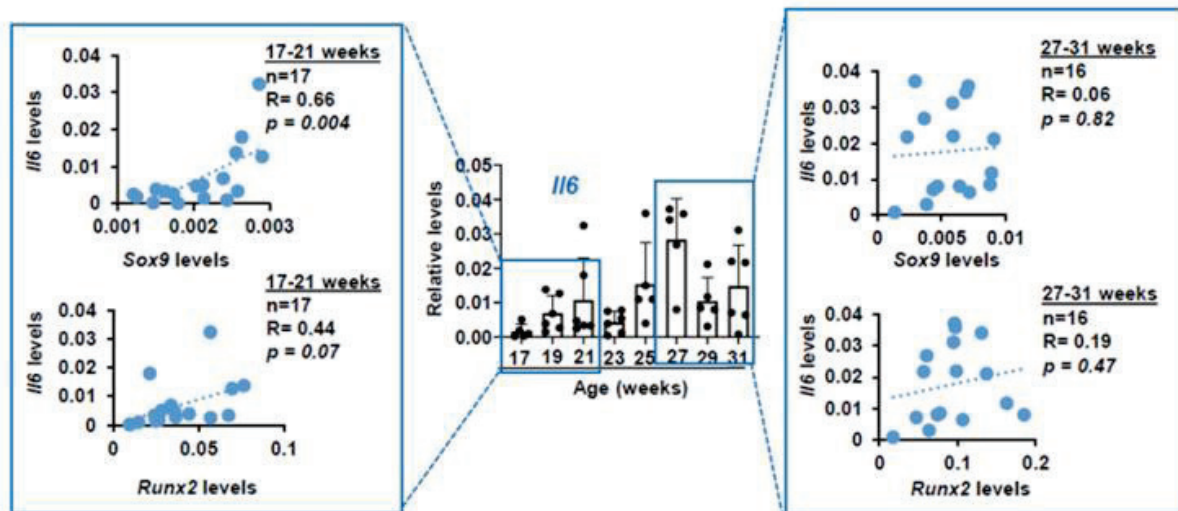


Figure 70 : Correlations entre les niveaux d'expression d'Il-6 et Sox9 ou Runx2 entre 17 et 21 semaines (calcifications précoces, n = 17 souris) et 27 et 31 semaines (calcifications avancées, n = 16 souris). Les corrélations sont calculées à l'aide du test de corrélation de Pearson's.

11.3. Corrélation entre *Tnf-α*, *Sox9* et *Runx2*

Enfin, les coefficients de corrélation mesurés pour les semaines 17 à 21, entre les valeurs d'expression de *Tnf-α* et *Sox9*, d'une part, et de *Tnf-α* et *Runx2*, d'autre part, sont R = 0,51 avec p = 0,04 et R = 0,67 avec p = 0,003, respectivement (Fig.71).

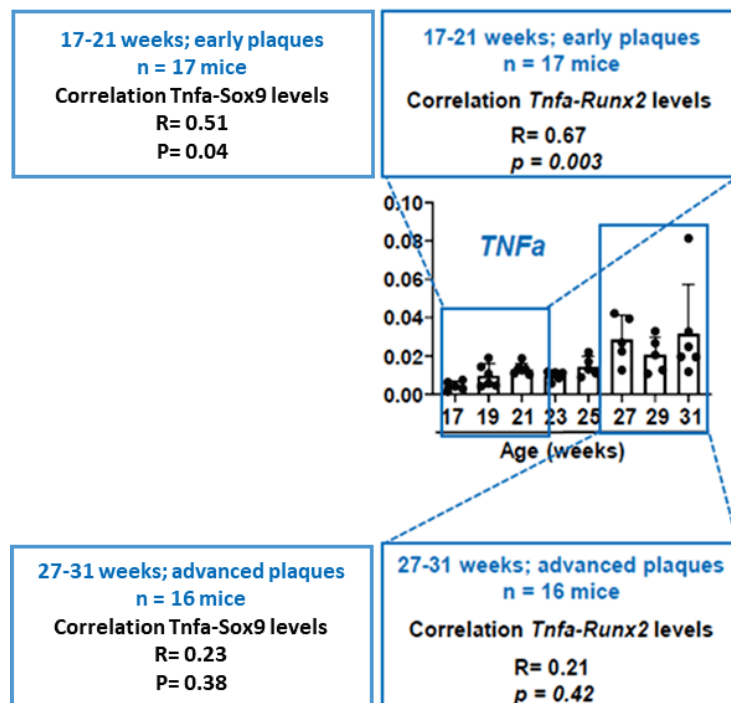


Figure 71 : Correlations entre les niveaux d'expression de *Tnf-α*, *Sox9* et *Runx2* entre 17 et 21 semaines (calcifications précoces, n = 17 souris) et 27 et 31 semaines (calcifications avancées, n = 16 souris). Les corrélations sont calculées à l'aide du test de corrélation de Pearson's.

Ces données montrent une forte corrélation positive entre IL-6 et l'un ou l'autre des marqueurs ostéochondrocytaires à des temps précoces. Les coefficients de corrélation mesurés pour les semaines 27 à 31, entre les valeurs d'expression de *Tnf- α* et *Sox9*, d'une part, et de *Tnf- α* et *Runx2*, d'autre part, sont $R = 0,23$ avec $p = 0,38$ et $R = 0,21$ avec $p = 0,42$, respectivement. Ces données montrent une faible corrélation positive, non significative, entre ces différentes variables à des temps tardifs (Fig.71).

L'ensemble de ces données montre qu'il existe une corrélation entre l'inflammation et la trans-différenciation ostéochondrocytaire, tout au moins à des temps précoces. Il est donc possible que l'inflammation stimule la trans-différenciation ostéochondrocytaire dans les premiers stades du développement des calcifications des plaques athéroscléreuses, puis devienne sans effets sur ce processus cellulaire à des stades plus avancés.

II. Traitement des souris ApoE^{-/-} avec l'inhibiteur de la TNAP

Après avoir validé la présence de la TNAP dans les plaques athéroscléreuses, nous avons plus précisément étudié son rôle dans la calcification des plaques chez les souris ApoE^{-/-}. Il faut rappeler qu'il n'existe pas aujourd'hui de thérapie permettant de freiner significativement le développement des calcifications vasculaires, donc des études d'inhibition de la TNAP pourrait permettre d'identifier une cible thérapeutique potentielle.

1. Mise au point du modèle d'étude

Dans le but d'établir le rôle fonctionnel de la TNAP dans les plaques athéroscléreuses, nous avons inhibé la TNAP chez les souris ApoE^{-/-} par administration orale d'un inhibiteur spécifique de la phosphatase alcaline nouvellement développé, le SBI-425 (SBI).

1.1. Validation de l'inhibition de la TNAP par le SBI chez des souris C57BL/6

Dans un premier temps et afin de valider l'efficacité de cet inhibiteur une fois incorporé dans la nourriture et administré par voie orale, nous avons tout d'abord étudié son effet sur deux groupes de souris mâles C57BL/6 âgées de 7 semaines, divisées en un groupe de 6 souris (CT) nourries à volonté avec un régime riche en gras et un deuxième groupe de 6 souris (SBI) nourries à volonté avec le même régime riche en gras contenant le SBI, pendant 2 jours. Après ponction sanguine et euthanasie des animaux, nous avons réalisé un dosage de l'activité enzymatique de la TNAP circulante. Les valeurs d'activité spécifique de la TNAP sont $0,357 \pm 0,072$ nmol/min/mg pour les souris CT et de $0,061 \pm 0,011$ nmol/min/mg pour les souris traitées oralement par le SBI pendant 2 jours. La forte, et significative, inhibition mesurée (83 %) permet de valider l'efficacité du SBI administré par voie orale sur l'activité enzymatique de la TNAP circulante (Fig.72).

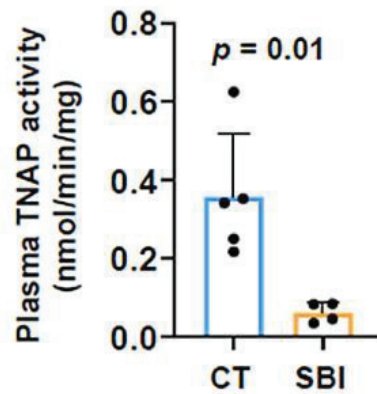


Figure 72 : Dosage de l'activité enzymatique de la TNAP dans le plasma des souris C57BL/6 contrôles (CT) et des souris C57BL/6 traitées avec le SBI (SBI). [(n = 5 souris CT et n = 4 souris SBI)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm SEM. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

1.2. Suivi du poids corporel des souris ApoE^{-/-}

En nous basant sur les résultats obtenus dans la partie A, nous avons choisi d'inhiber la TNAP à partir de la semaine 10, jusqu'à la semaine 25 (n = 26 souris ApoE^{-/-} : 13 souris CT et 13 souris SBI, cohorte 3), caractérisée par des calcifications précoces, ainsi que de la semaine 10 à la semaine 31 (n = 26 souris ApoE^{-/-} : 13 souris CT et 13 souris SBI, cohorte 4), caractérisée par des calcifications tardives.

Tout le long de la période expérimentale, nous avons suivi le poids corporel des souris CT et des souris SBI dans les cohortes 3 et 4. Le traitement des souris avec le SBI jusqu'à la semaine 31 ne montre aucun effet significatif sur la prise de poids ou bien la mortalité par rapport aux souris CT (Fig.73). Nous avons constaté que parmi les 26 souris CT, 3 souris sont mortes entre les semaines 20 et 26 et parmi les 26 souris SBI, 5 sont mortes entre les semaines 17 et 27. Nous avons remarqué que plusieurs souris SBI souffrent de démangeaisons à partir de la semaine 12. Nous avons déjà constaté que les souris ApoE^{-/-} souffraient de démangeaisons 4 semaines après le début du régime riche en gras. Il semble que les souris traitées en plus par le SBI développent ces démangeaisons de manière plus précoce.

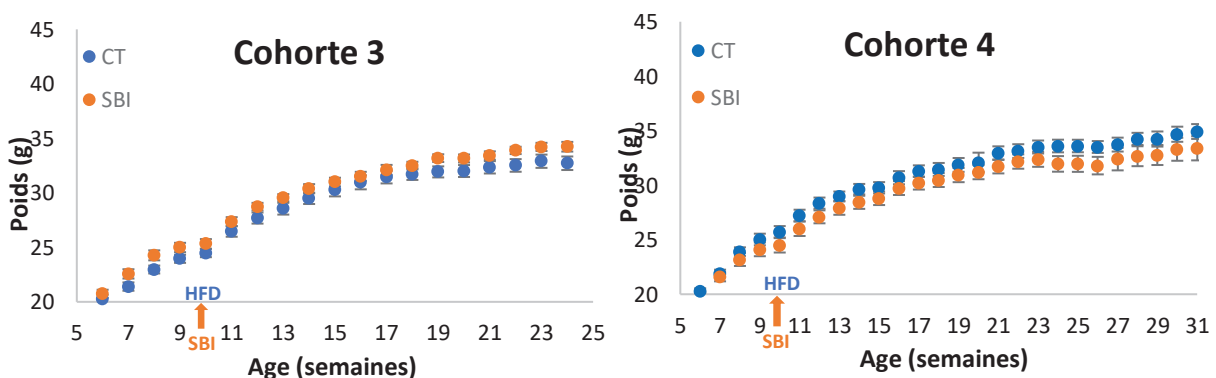


Figure 73 : Evolution du poids corporel des souris CT et SBI en fonction de l'âge.

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm SEM.

1.3. Dosage de la TNAP sérique des souris ApoE^{-/-}

A l'issue des deux périodes d'inhibition de la TNAP par le SBI, nous avons dosé l'activité de la TNAP dans le sérum des souris des 2 groupes sacrifiés à la semaine 25 et à la semaine 31 (Fig.74).

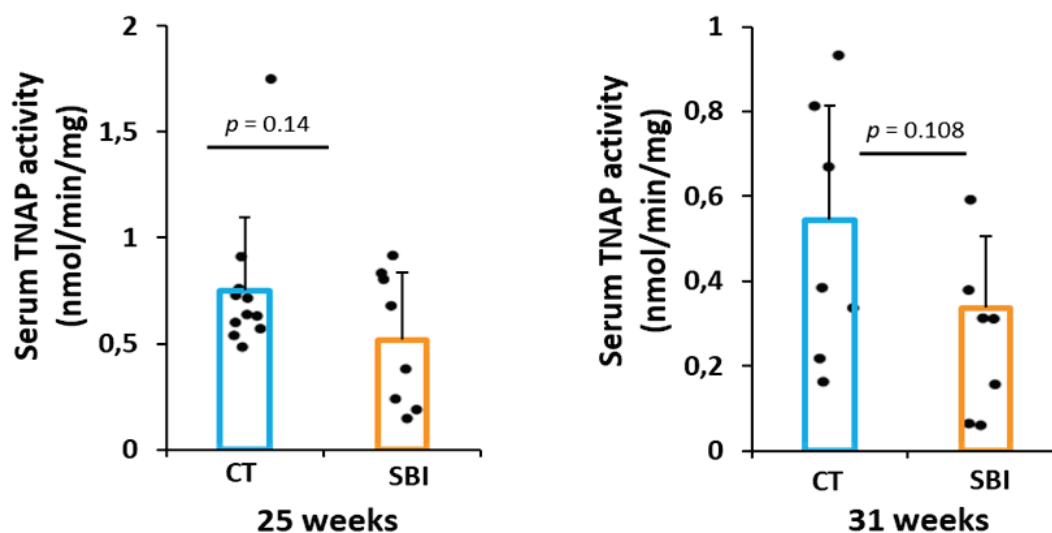


Figure 74 : Dosage de l'activité enzymatique de la TNAP dans le sérum des souris CT et des souris SBI à 25 semaines (A) et 31 semaines (B). [(n = 11 souris CT et n = 8 souris SBI à 25 semaines ; n = 7 souris CT et n = 7 souris SBI à 31 semaines)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

Les activités spécifiques de la TNAP sont égales à $0,751 \pm 0,105$ mol/min/mg pour les souris CT, et à $0,519 \pm 0,112$ mol/min/mg pour les souris SBI. Ces valeurs indiquent une inhibition de 31 % à la semaine 25, après 10 semaines de régime. A la semaine 31, après 21 semaines de traitement, les activités spécifiques de la TNAP sont de $0,499 \pm 0,099$ et $0,337 \pm 0,064$ mol/min/mg pour les souris CT et SBI, respectivement. L'inhibition de la TNAP dans ces conditions est de 32,5 %. Il est important de noter que les valeurs montrent une grande hétérogénéité d'une souris à l'autre. De plus, la différence des valeurs d'inhibition observées entre les groupes de souris C57BL/6 (paragraphe 5.1.1.) et les cohortes 3 et 4 de souris ApoE^{-/-} provient vraisemblablement du fait que les souris C57BL/6 n'ont pas été mises à jeun la veille du sacrifice, contrairement aux souris des cohortes 3 et 4, et donc que l'absorption de SBI datait d'au moins 12 heures chez ces souris

Néanmoins, l'activité enzymatique spécifique de la TNAP sérique montre une diminution en présence de SBI (Fig.74). Ces valeurs valident donc l'efficacité du SBI dans le modèle de souris ApoE^{-/-}.

1.4. Inhibition de la TNAP et architecture osseuse

Nous avons établi une collaboration avec le laboratoire (LYOS - INSERM U1033, Faculté de Médecine Lyon Est, Lyon, France) pour réaliser des analyses osseuses dans le but de faire le point sur l'effet de l'inhibition globale de la TNAP sur l'architecture osseuse. Les résultats obtenus montrent que la fraction volumique des fémurs (ou fraction de volume osseux trabéculaire BV/TV), le nombre de travées (Tb Number) et l'épaisseur des travées (Tb Thickness) ne changent pas dans le groupe des souris SBI par rapport aux souris CT à la semaine 31 (Fig.75, A). De même, concernant l'os cortical, son épaisseur (Cort Th) ainsi que sa densité minérale osseuse (BMD) ne varient pas à 31 semaines (Fig.75, B). L'ensemble de ces valeurs suggère que l'inhibition de la TNAP par le SBI n'a pas d'effet sur l'architecture osseuse, et ce en tout cas pour des souris traitées pendant 21 semaines. Ce résultat pourrait s'expliquer du fait que la croissance osseuse des souris de plus de 10 semaines est majoritairement achevée et que le remodelage est relativement lent.

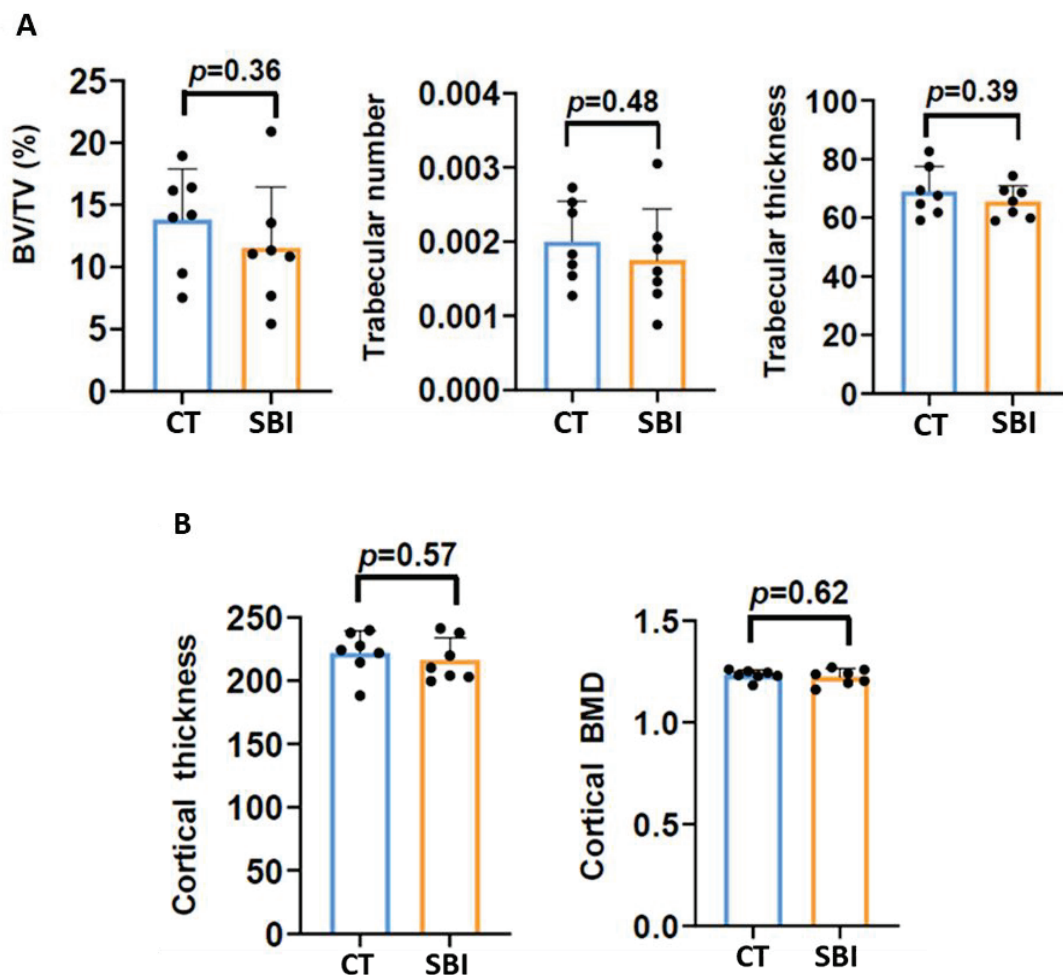


Figure 75 : Paramètres d'architecture osseuse des fémurs et tibias déterminés à 31 semaines chez les souris CT et SBI de la cohorte 4 (in-vivo). [(n=7 par groupe)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student. BMD = DMO : densité minérale osseuse ; BV : volume osseux ; TV : volume total.

2. Inhibition de la TNAP et détection des calcifications

2.1. Détection des calcifications *in-vivo*

Nous avons utilisé les méthodes d'analyse décrites dans la partie A afin d'étudier l'effet de l'inhibition de la TNAP sur la formation des calcifications dans les plaques athéroscléreuses des souris ApoE^{-/-}.

Dans un premier temps, nous avons déterminé *in-vivo*, par μ CT et μ TEP, l'effet du SBI sur la formation des calcifications. D'une part, le volume des calcifications, déterminé grâce aux images obtenues par μ CT, montre clairement que 6 parmi les 11 souris CT présente des calcifications, alors qu'aucun signal n'est détecté chez les 12 souris SBI à la semaine 25 (Fig.76, A). Par contre, lors d'un traitement plus long, jusqu'à la semaine 31, les calcifications sont visibles chez les souris CT et SBI, avec des volumes statistiquement non différents (Fig.76, A).

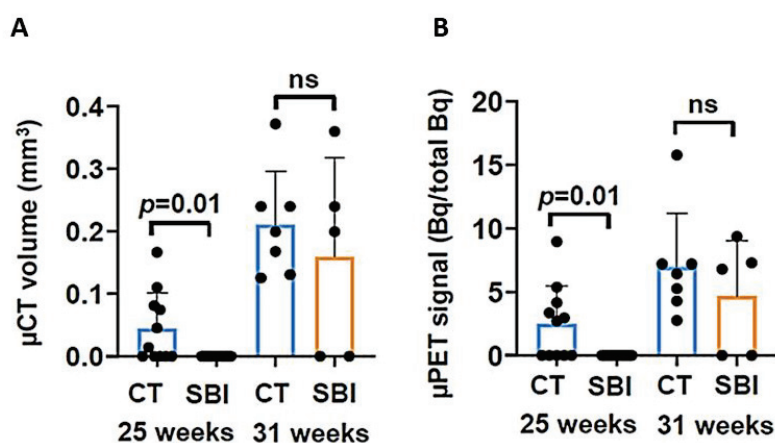


Figure 76 : Quantification *in-vivo* du volume de calcification mesuré par μ CT (A) et de l'activité de calcification mesurée par μ TEP (B) dans les aortes des souris de la cohorte 4 (*in-vivo*). [(n = 11 souris CT et n = 12 souris SBI à 25 semaines ; n = 7 souris CT et n = 5 souris SBI à 31 semaines)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test de Mann-Whitney. CT : tomographie par émission de positons ; TEP : tomographie par émission de positons. ns : non significatif.

D'autre part, les mesures d'intensité des signaux obtenus par μ PET, à la semaine 25, montrent l'absence de signal, donc de calcification active, pour les souris SBI alors que les souris CT présentent un signal d'incorporation du ¹⁸F-NaF. Puis, comme observé par μ CT, des signaux μ PET sont détectés à la fois chez les souris CT et les souris SBI à la semaine 31, d'intensités statistiquement non différentes. (Fig.76, B).

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'inhibition de la TNAP à court terme, pendant 15 semaines prévient complètement la formation des calcifications précoces puis, que l'inhibition de la TNAP à long terme, pendant 21 semaines, ne permet plus d'empêcher la formation des calcifications. L'effet du SBI semble se limiter à ralentir la survenue des calcifications sans permettre de les inhiber totalement.

2.2. Détection des calcifications *ex-vivo*

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé l’osteosense afin de détecter plus précisément, et de caractériser *ex-vivo*, les calcifications dans les coupes d’arche aortique des souris CT et SBI (Fig.77, A), cette méthode étant considérée comme plus sensible que les méthodes utilisées *in-vivo* (voir partie A). Comme précédemment, dans le but de confirmer les observations qualitatives, nous avons déterminé le nombre de calcifications observées dans les artères des souris CT et SBI.

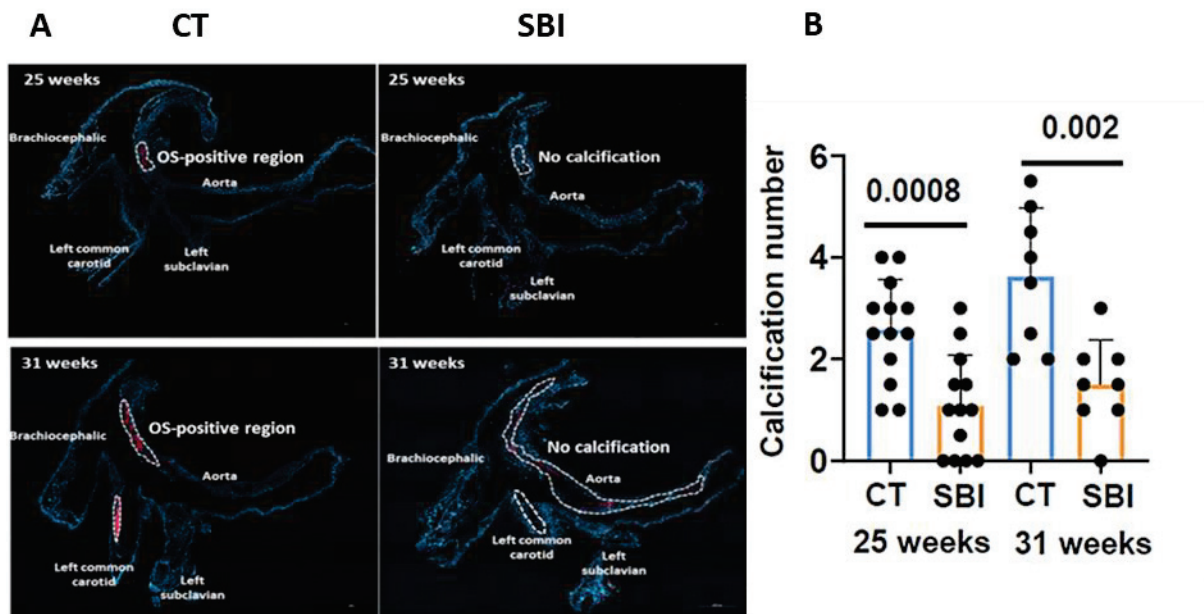


Figure 77 : (A) Analyses histologiques de la calcification après coloration OS des coupes d’arche aortique des souris CT et SBI à 25 et 31 semaines. Les zones positives à l’OS comparées aux zones négatives à l’OS sont encerclées en blanc. (B) Quantification histologique du nombre de calcifications dans les coupes d’arche aortique des souris CT et SBI dans la cohorte 3 (*ex-vivo*). [(n = 13 souris CT et n = 13 souris SBI à 25 semaines ; n = 8 souris CT et n = 8 souris SBI à 31 semaines)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l’aide du test-t de Student.

Les valeurs calculées à partir des colorations des coupes d’arche aortique à la semaine 25 montrent que l’ensemble des 13 souris CT présentent des calcifications alors que, parmi les 13 souris SBI, seules 9 souris ont développé des calcifications. Nous avons mesuré entre 1 et 4 calcifications par coupe d’arche aortique de souris CT et seulement entre 0 et 3 pour les souris SBI, à la semaine 25 (Fig.77, B). Cette diminution significative en présence de SBI est également observée à la semaine 31, avec entre 2 et 6 calcifications pour les souris CT et entre 0 et 3 pour les souris SBI. Le nombre des calcifications précoces (semaine 25) ainsi que des calcifications tardives (semaine 31) est donc moindre chez les souris SBI par rapport aux souris CT (Fig.77, B).

En complément des résultats mettant en évidence le nombre de calcifications après traitement à court et à long termes (Fig.77), nous avons, comme précédemment, quantifié par Image J la surface moyenne de ces calcifications. La surface moyenne des calcifications observées dans les coupes d'arche aortique de souris CT à 25 semaines est du même ordre de grandeur que celle observée dans la cohorte 1 (partie A, Fig.56, B).

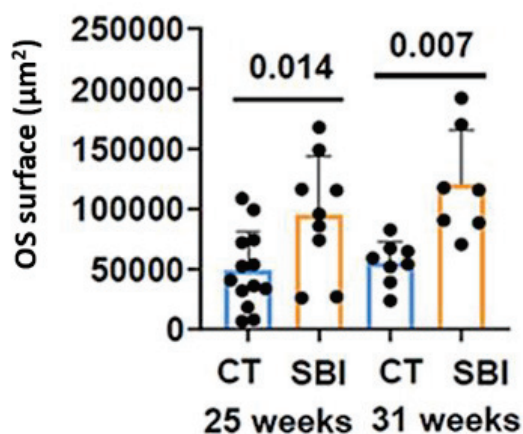


Figure 78 : Quantification histologique de la surface moyenne des calcifications dans les coupes d'arche aortique des souris CT et SBI positives à l'OS (nombre de calcifications non nul). [(n = 13 souris CT et n = 9 souris SBI à 25 semaines ; n = 8 souris CT et n = 7 souris SBI à 31 semaines)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

Nous avons mesuré une augmentation significative, d'un facteur 2, de la surface moyenne des calcifications chez les souris SBI traitées à court et long termes par rapport aux souris contrôles (Semaines 25 et 31), ce qui est l'inverse de la réduction significative du nombre de calcifications observée précédemment chez les souris SBI âgées de 25 et 31 semaines (Fig.78). Ces résultats semblent signifier que des microcalcifications ont pu se former malgré la présence du SBI et que ces quelques calcifications voient ensuite leur taille augmenter de façon importante.

3. Expression génique de l'*Opn* dans les aortes abdominales en réponse à l'inhibition

Comme décrit dans la littérature, la TNAP peut déphosphoryler des protéines *in-vivo*. Parmi ces protéines, l'*Opn* est la première qui a été suggérée comme étant un substrat de la TNAP. L'*Opn* est une glycoprotéine hautement phosphorylée exprimée dans plusieurs types cellulaires, comme par exemple les ostéoblastes et les ostéoclastes, et exerçant plusieurs fonctions : elle peut agir comme une cytokine inflammatoire, un inhibiteur inductible de la

calcification ectopique et un promoteur de la régression de la calcification ectopique. Par qPCR, nous avons mesuré son expression dans les aortes à 25 et 31 semaines. Nous avons observé une réduction significative de l'expression relative de *Opn* à la semaine 25 chez les souris SBI par rapport aux souris CT. Inversement, les résultats obtenus à la semaine 31 montrent une augmentation significative de l'expression de *Opn* chez les souris SBI par rapport aux souris CT (Fig.79).

Ces résultats laissent à penser que l'inhibition de la TNAP entraîne une diminution de l'expression de *Opn*, par inhibition de la formation des calcifications et en conséquence diminution de la formation de *Opn* qui devient moins nécessaire dans ces conditions.

L'inhibition de la TNAP à plus long terme, 31 semaines, ne permet pas de maintenir la diminution de l'expression de *Opn*, puisque, au contraire, une augmentation de son expression est observée. Ce résultat est sans doute lié à l'augmentation de la surface des calcifications observée précédemment (Fig.78). La surface croissante des microcalcifications qui peuvent quand se former même en présence de SBI, conduit à l'augmentation de l'expression de *Opn* afin de contrecarrer cet accroissement.

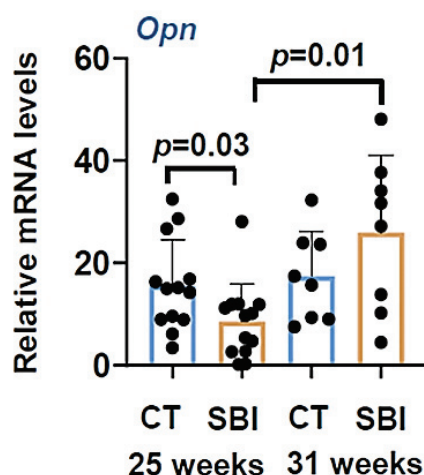


Figure 79 : Expression génique de l'*Opn* dans l'aorte abdominale des souris CT et SBI. [(n = 13 souris CT et n = 13 souris SBI à 25 semaines ; n = 8 souris CT et n = 8 souris SBI à 31 semaines)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

4. Inhibition de la TNAP et inflammation locale

Selon la littérature, la TNAP est présente dans le sang, ancrée à la membrane de neutrophiles qui sont souvent les premières cellules recrutées dans les plaques athéroscléreuses et responsables de la stimulation de l'inflammation. Nous avons montré précédemment que le développement de la maladie dans les souris ApoE^{-/-} s'accompagnait de vagues d'inflammation (paragraphe 10). D'autre part, des travaux de l'équipe ont permis

de souligner la participation probable de la TNAP dans les réactions inflammatoires. Nous avons donc recherché les conséquences, sans doute plus complexes que le ralentissement de la formation des calcifications, de l'inhibition de la TNAP dans l'inflammation observée.

Afin de vérifier l'impact de l'inhibiteur de la TNAP sur l'inflammation locale, nous avons mesuré, par qPCR, l'expression de marqueurs pro-inflammatoires tels que *Cd68*, *Il-6* et *Il-8*.

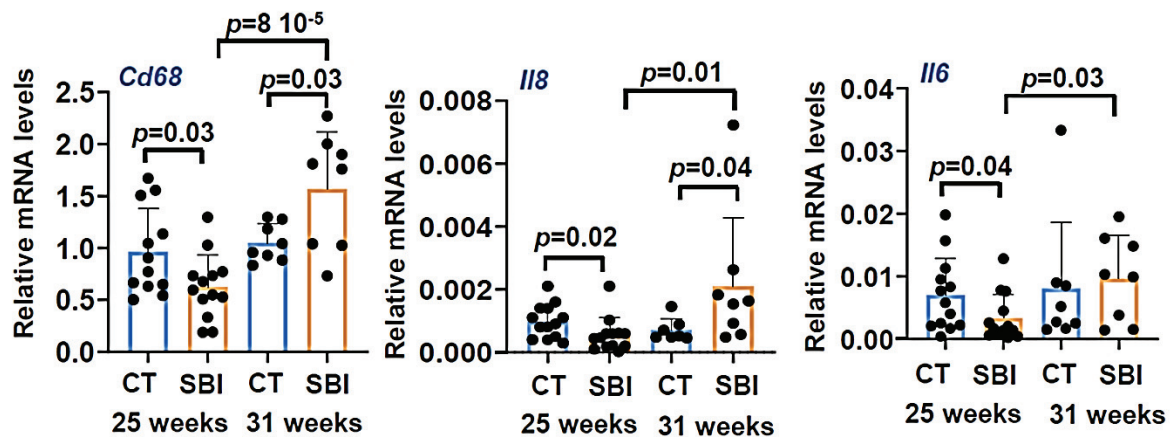


Figure 80 : Expression génique de *Cd68*, *Il-8* et *Il-6* dans l'aorte abdominale des souris CT et SBI. [(n = 13 souris CT et n = 13 souris SBI à 25 semaines ; n = 8 souris CT et n = 8 souris SBI à 31 semaines)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

L'expression de *Cd68* à la semaine 25 est significativement plus faible (1,5 x) chez les souris SBI que chez les souris CT. Par contre, à la semaine 31, l'expression de ce marqueur augmente significativement (1,5 x) chez les souris SBI par rapport aux souris CT. Les niveaux d'expression d'*Il-8* montrent les mêmes variations, respectivement 1,8 x plus faible à la semaine 25 et 3 x plus élevé à la semaine 31, alors que les résultats obtenus pour l'expression d'*Il-6* montrent une diminution significative à la semaine 25 (2 x) chez les souris SBI par rapport aux souris CT, mais aucune différence significative à la semaine 31 (Fig.80). L'ensemble de ces résultats signifie que l'inflammation est réduite lors du traitement des souris par le SBI, uniquement dans les stades précoces, lors de la formation des premières calcifications, alors qu'elle est stimulée dans les stades plus tardifs.

Ceci suggère que l'inhibition de la TNAP peut diminuer la calcification des plaques à 25 semaines, en partie en diminuant l'inflammation de la plaque, puis dans un effet à long terme jusqu'à 31 semaines, augmenter la surface moyenne des calcifications des plaques, au moins en partie en augmentant l'inflammation de la plaque.

5. Inhibition de la TNAP et inflammation systémique

La TNAP peut également être présente sous forme soluble dans le sang. Nous avons cherché à étudier si l'inhibition de la TNAP peut, non seulement avoir des effets sur l'inflammation locale, mais également sur l'inflammation systémique dans le contexte athérosclérotique. Nous avons dosé par ELISA des marqueurs inflammatoires tels que l'haptoglobine et l'IL-6 dans le sérum des souris SBI et CT.

Nous avons observé que les concentrations sériques d'IL-6 présentées dans la figure 83 sont de 121 ± 114 pg.mL⁻¹ dans le sérum des souris CT, et de 64 ± 49 pg.mL⁻¹ dans le sérum des souris SBI, soit une diminution de 47 % à la semaine 25. Les concentrations sont plus élevées à la semaine 31, respectivement 159 ± 213 pg.mL⁻¹ et 74 ± 91 pg.mL⁻¹ dans le sérum des souris CT et SBI, mais présentent aussi une baisse chez les souris traitées par l'inhibiteur de la TNAP. Nous avons remarqué les mêmes tendances à la baisse pour l'haptoglobine, autre marqueur d'inflammation systémique chez la souris dosée par ELISA, chez les souris SBI par rapport aux souris CT que ce soit à la semaine 25 ou à la semaine 31 (Fig.81).

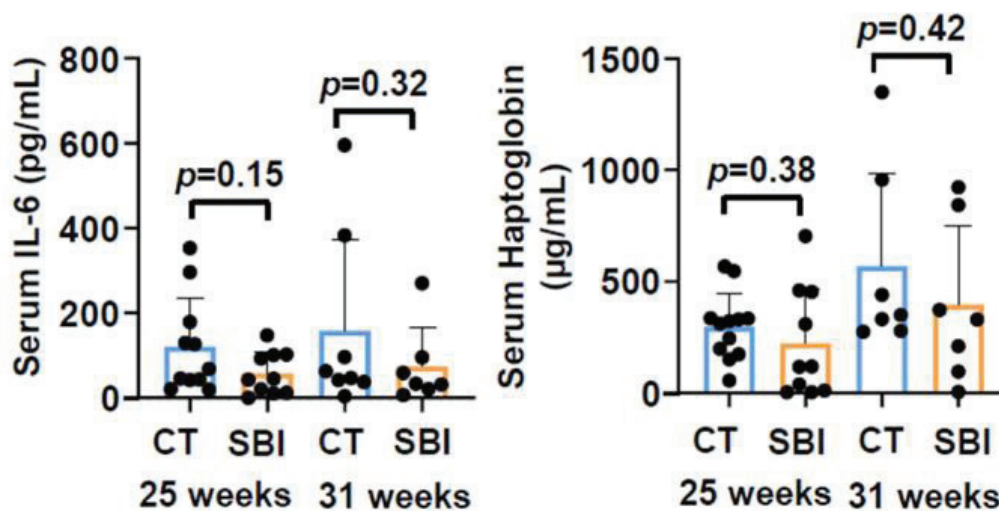


Figure 81 : Dosage d'IL-6 (A) et d'haptoglobine (B) dans le sérum des souris CT et SBI. [(n = 12 souris CT et n = 10 souris SBI à 25 semaines ; n = 7 souris CT et n = 7 souris SBI à 31 semaines)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test de Mann-Whitney.

Cependant, ces résultats mettent également en évidence une grande variabilité des niveaux d'inflammation systémique révélés par l'IL-6 ou par l'haptoglobine.

Au vu de cette hétérogénéité, il semble probable que le SBI n'a pas, ou peu, d'effet sur l'inflammation systémique. Il est donc vraisemblable que son effet se limite à une action directe sur l'inflammation locale, telle qu'observée par la présence des macrophages (expression de *Cd68*, paragraphe 4) ou l'expression des marqueurs inflammatoires (*Il-8* et *Il-6*, paragraphe 4) dans les stades précoces de la formation des calcifications des plaques.

6. Inhibition de la TNAP et métaplasie cartilagineuse

Comme déjà mentionné dans la littérature, l'inflammation est un inhibiteur bien connu de la formation osseuse. Nous avons précédemment montré qu'il est possible que l'inflammation stimule la trans-différenciation ostéochondrocytaire dans les premiers stades du développement des calcifications des plaques athéroscléreuses, puis devienne sans effets sur ce processus cellulaire à des stades plus avancés (paragraphe 10).

Pour comprendre les résultats obtenus sur l'effet localement anti-inflammatoire du SBI à la semaine 25 et afin de tenter d'expliquer son effet localement pro-inflammatoire à la semaine 31, nous avons mesuré dans les aortes abdominales l'expression de marqueurs ostéochondrocytaires tels que *Sox9*, *Acan* et *Runx2*, considérés comme les principaux facteurs impliqués dans la trans-différenciation ostéochondrocytaire. Les niveaux d'expression de *Sox9*, *Acan* et *Runx2* ne sont pas modifiés par le traitement par le SBI chez les souris âgées de 25 semaines. Par contre, à la semaine 31, nous avons remarqué une augmentation significative dans l'expression de *Sox9* chez les souris SBI par rapport aux souris CT et une tendance vers la hausse concernant les deux autres gènes (*Acan* et *Runx2*). Fait intéressant, nous avons aussi remarqué une forte augmentation significative dans l'expression de ces trois gènes (*Sox9*, *Acan* et *Runx2*) chez les souris SBI âgées de 31 semaines par rapport aux souris SBI âgées de 25 semaines (Fig.82).

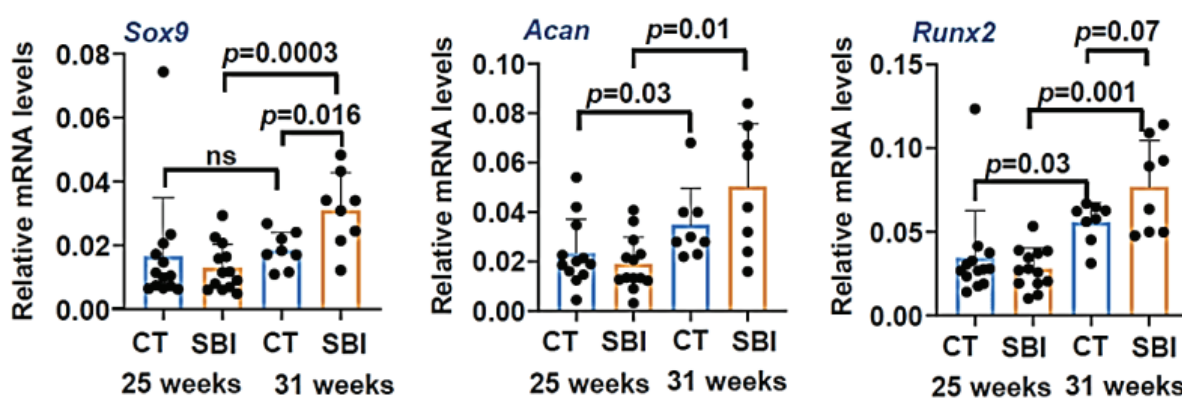


Figure 82 : Expression génique de *Sox9*, *Acan* et *Runx2* dans l'aorte abdominale des souris CT et SBI. [(n = 13 souris CT et n = 13 souris SBI à 25 semaines ; n = 8 souris CT et n = 8 souris SBI à 31 semaines)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

Ces résultats suggèrent qu'il n'existe pas de lien entre l'inhibition de l'inflammation et la trans-différenciation ostéochondrocytaire aux temps précoces. Par conséquent, l'effet du SBI à court terme se limiterait à l'inhibition de l'inflammation et donc la prévention des calcifications, et non pas à la l'inhibition de la trans-différenciation ostéochondrocytaire.

D'un autre côté, le SBI accélère la formation du cartilage à long terme, dans les plaques tardives, suggérant que l'augmentation de la calcification, induite par la prolongation de l'inhibition de la TNAP de 25 à 31 semaines, est en outre due à la différenciation accrue des cellules de type ostéochondrocytaire.

7. Inhibition de la TNAP et développement des plaques

Dans le but de suivre l'effet du SBI sur le développement global des plaques, nous avons quantifié par image J la surface des plaques athéroscléreuses des souris CT et des souris SBI aux semaines 25 et 31. Les mesures obtenues révèlent une diminution significative (de 30 %) de la surface des plaques des souris SBI âgées de 25 semaines par rapport aux souris CT, alors que les surfaces mesurées sont équivalentes entre les souris CT et SBI lorsque les souris sont âgées de 31 semaines, après 21 semaines de traitement (Fig.83). Il est aussi important de remarquer que la surface des plaques augmente au cours du temps pour chacun des deux groupes de souris, avec des valeurs augmentant entre les semaines 25 et 31 de 1250 à 1700 μm^2 (augmentation de 36 %) dans le cas des souris CT et de 800 à 1600 (augmentation de 100 %) dans le cas des souris SBI.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la TNAP à court terme réduit la croissance des plaques, alors que son inhibition à long terme semble, au contraire, entrainer une croissance accélérée des plaques.

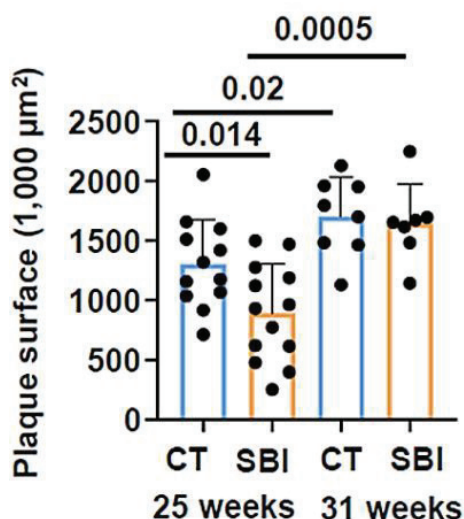


Figure 83 : Quantification histologique de la surface totale des plaques dans les coupes d'arche aortique des souris CT et SBI. [(n = 12 souris CT et n = 13 souris SBI à 25 semaines ; n = 8 souris CT et n = 7 souris SBI à 31 semaines)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

8. Inhibition de la TNAP et lipides circulants

Enfin, nous avons étudié l'effet du SBI sur les lipides circulants (triglycérides et cholestérol) chez les souris de notre étude. Nous avons mesuré la concentration de triglycérides et de cholestérol dans le sérum des souris âgées de 25 et 31 semaines (Fig.84).

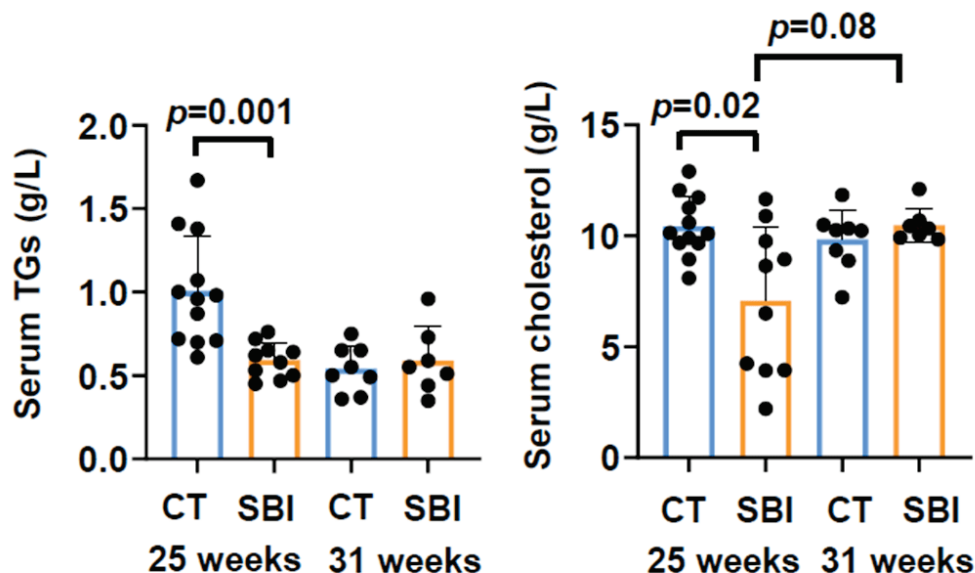


Figure 84 : Dosages de TG (A) et de cholestérol (B) dans le sérum des souris CT et SBI. [(n = 12 souris CT et n = 10 souris SBI à 25 semaines ; n = 8 souris CT et n = 7 souris SBI à 31 semaines)]. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student. TG : triglycérides.

Nous avons remarqué une diminution significative du taux de triglycérides sérique (de 1 g/L à 0,6 g/L) et du taux de cholestérol sérique (de 10,5 g/L à 7 g/L) chez les souris SBI par rapport aux souris CT, à la semaine 25. A la semaine 31, les concentrations en triglycérides sont équivalentes entre les souris CT et SBI, et plus faibles que celle des souris CT à la semaine 25. Les concentrations en cholestérol à la semaine 31 sont identiques et équivalentes à celle obtenue pour les souris CT à la semaine 25 (Fig.84).

D'un autre côté, en comparant les concentrations de cholestérol sérique des souris SBI entre la semaine 25 et la semaine 31, nous avons remarqué une hausse de 48 % chez les souris SBI âgées de 31 semaines par rapport aux souris SBI âgées de 25 semaines (Fig.84). Cela signifie que l'effet bénéfique du SBI sur la lipidémie à court terme (semaine 25) est perdu lorsque le traitement est prolongé jusqu'à la semaine 31.

Il est assez surprenant d'observer une diminution des lipides circulants suite à l'inhibition de la TNAP après 10 semaines de traitement par le SBI. Des études métaboliques plus approfondies seront nécessaires pour expliquer ces observations, néanmoins nous avons commencé par rechercher une implication hépatique dans ces observations.

9. Expression génique de l'Alpl dans le foie

Nous avons tout d'abord mesuré par qPCR l'expression génique d'Alpl dans le foie des souris ApoE^{-/-}. Au cours du temps, l'expression relative d'Alpl indique une augmentation sous forme d'un pic à la semaine 21, suivi d'une diminution permettant d'atteindre un niveau stable entre les semaines 27 et 31 (Fig.85, A). Ensuite nous avons vérifié s'il existe une corrélation entre l'expression de la TNAP hépatique et l'activité de la TNAP sérique. Nous avons obtenu un coefficient de corrélation R égal à 0,87 et une valeur de p égale à 0,023, ce qui indique une forte corrélation positive entre l'expression d'Alpl hépatique et l'activité de la TNAP circulante (Fig.85, B). Il semble donc que le foie pourrait être impliqué dans la libération de la TNAP chez les souris athéroscléreuses.

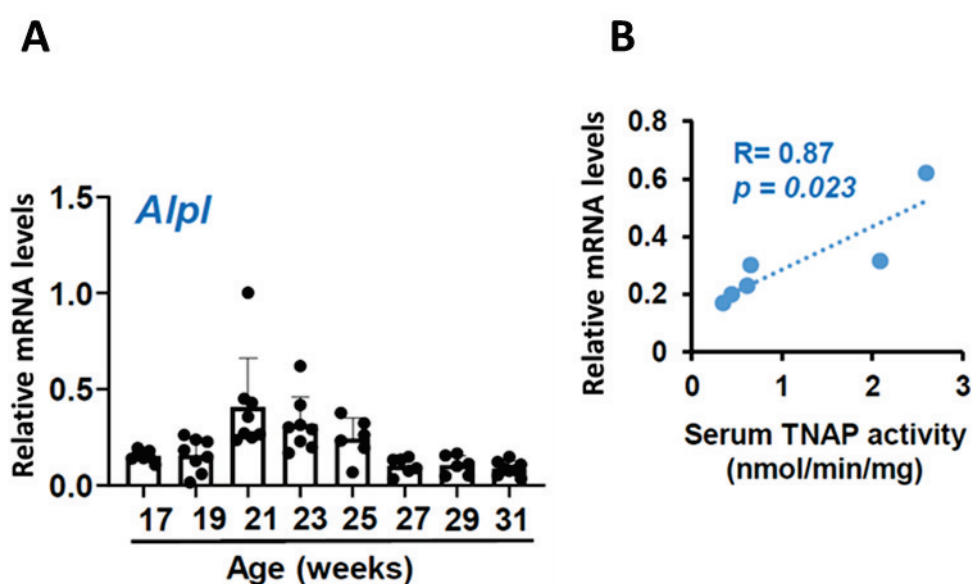


Figure 85 : (A) Expression génique d'Alpl dans le foie des souris ApoE^{-/-} (n = 8 à S17, S19, S21, S23, et S31 ; n = 6 à S25 ; n = 5 à S27 et S29). (B) Corrélation entre le niveau d'expression d'Alpl dans le foie et l'activité de la TNAP sérique à 25 semaines. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± écart-type.

10. Inflammation et fibrose dans le foie

Bien que la TNAP soit relativement faiblement exprimée dans le foie, nous avons cherché le rôle qu'elle pouvait y jouer. Nous avons mesuré par qPCR l'expression génique du facteur pro-inflammatoire *Tnf-α* ainsi que des facteurs pro-fibrogéniques *Tgf-β* et *Col1*.

Dans le foie, une faible expression génique de *Tnf-α*, qui reste relativement stable entre 17 et 31 semaines, est observée, avec néanmoins deux périodes d'augmentation, aux semaines 19 et 27. L'expression de *Tgf-β* présente également deux pics peu marqués à 21-23 et 27 semaines. Nous notons aussi que l'expression est hétérogène au sein de chaque groupe de souris (à chaque semaine). L'expression de *Col1a2* est faible en dehors d'un pic d'expression

important autour de 23 semaines (Fig.86, A). Là encore, nous notons que l'expression de *Col1a2* à la semaine 23 montre une grande hétérogénéité. Compte tenu de ces résultats, nous avons vérifié la possibilité d'une corrélation entre l'expression de *Col1a2* hépatique et l'activité de la TNAP sérique entre 17 et 31 semaines. Nous avons obtenu un coefficient de corrélation R égal à 0,89, et une valeur de p égale à $2,3 \cdot 10^{-17}$, ce qui représente une forte corrélation positive entre les deux séries de valeurs (Fig.86, B).

L'ensemble des résultats obtenus suggère qu'une fibrose hépatique apparaît pendant l'administration du régime riche en gras et qu'elle pourrait être responsable de la libération de la TNAP dans le sang.

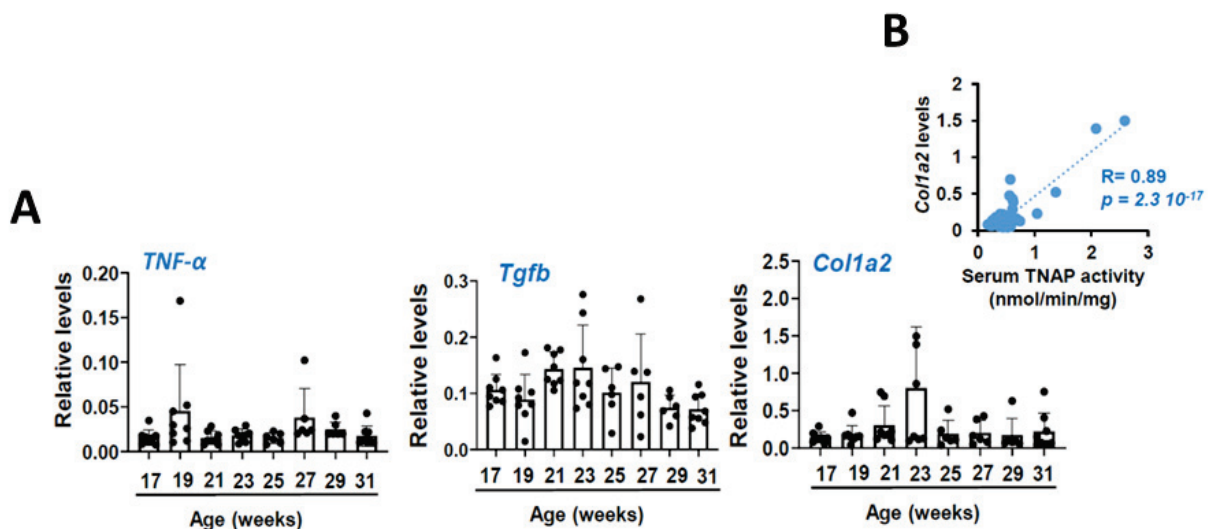


Figure 86 : (A) Expression génique de *TNF-α*, *TGF-β* et *Col1a2* dans le foie des souris *ApoE*^{-/-} ($n = 8$ à S17, S19, S21, S23, et S31 ; $n = 6$ à S25 ; $n = 5$ à S27 et S29). (B) Corrélation entre les niveaux d'expression de *Col1a2* dans le foie et l'activité de la TNAP sérique entre 17 et 31 semaines. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écart-type.

Collectivement, ces résultats indiquent que l'inhibition de la TNAP par le SBI impacte significativement le développement des plaques d'athérosclérose, et que de façon relativement inattendue, ces effets sont probablement dus au moins en partie à l'inhibition de la TNAP hépatique, et à la diminution de la libération de cholestérol et de triglycérides du foie vers le sang. Des expériences sont en cours actuellement au laboratoire pour essayer de comprendre les mécanismes en jeu, qui pour l'instant demeurent extrêmement obscurs.

Partie B : Effet des cristaux sur la transdifférenciation des CML vers des cellules ostéochondrocytaires

1. Mise au point du modèle *in-vitro*

Il est maintenant établi que les CML jouent un rôle majeur à différents stades de l'athérosclérose. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la calcification vasculaire nous avons choisi d'utiliser la lignée de CML de souris « MOVAS » comme modèle *in-vitro*.

Il a été montré dans la littérature que les MOVAS, en présence de β -glycérophosphate et d'acide ascorbique, expriment la TNAP et minéralisent leur matrice extracellulaire³⁶³. Un deuxième article a montré que les MOVAS, en présence de β -glycérophosphate, d'acide ascorbique et d'insuline, subissent une trans-différenciation chondrocytaire³⁶⁴. Un troisième article, qui correspond aux travaux de notre laboratoire, a montré que les MOVAS en présence de phosphatase alcaline, et d'acide ascorbique, subissent une trans-différenciation chondrocytaire mise en évidence par les niveaux de transcrits de marqueurs chondrocytaires tels que l'aggrécane, le collagène de type X et l'ostéocalcine²⁹⁰. Pour compléter ces travaux, nous avons étudié la réponse des MOVAS suite à l'exposition à des cristaux de phosphate de calcium (cristaux d'hydroxyapatite « HA ») en suspension dans le milieu de culture cellulaire, sans différenciation préalable par le β -glycérophosphate et l'acide ascorbique.

Les cellules sont donc cultivées en absence ou en présence de doses croissantes de cristaux d'HA (3, 30 et 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pendant des temps courts (2, 4 et 8 heures) ou plus longs (1, 5 et 8 jours) (Fig.87). Nous avons analysé les conséquences de ce traitement sur l'expression de plusieurs marqueurs inflammatoires et ostéo-chondrocytaires par qPCR.

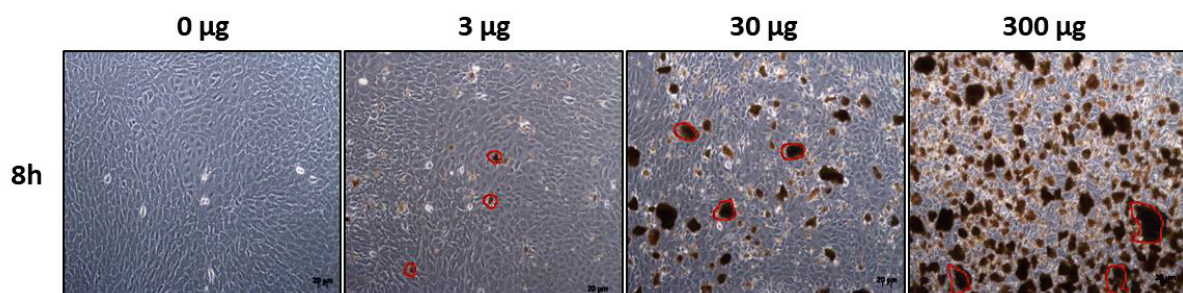


Figure 87 : Observation microscopique des MOVAS non traitées (CT, 0 μg) et traitées avec des doses croissantes de cristaux d'hydroxyapatite (HA : 3, 30 et 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (cercles rouges visibles sur les photos) après 8 h.

2. Expression génique de l'*Opn* en réponse aux cristaux

Dans un premier temps, nous avons considéré l'*Opn* comme un contrôle positif de l'effet des cristaux puisque c'est un inhibiteur de la minéralisation induit par la présence de cristaux. Par qPCR, nous avons suivi son expression génique au cours du temps en fonction des différentes doses de cristaux d'HA. L'expression d'*Opn* au cours du temps avec la dose la plus faible ($3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) n'est pas modifiée par rapport aux cellules non traitées (CT) et son expression est légèrement augmentée avec la dose intermédiaire ($30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Par contre, le traitement avec la plus forte dose qui correspond à $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, montre une augmentation détectée dès 8 h de traitement, quoique non significative, et plus importante encore à J1 et J5 ($\times 10$) par rapport aux CT (Fig.88). Ces résultats montrent que les MOVAS répondent à l'exposition à une dose de $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de cristaux d'HA. Pour les expériences suivantes, les cristaux ont donc été utilisés à cette dose.

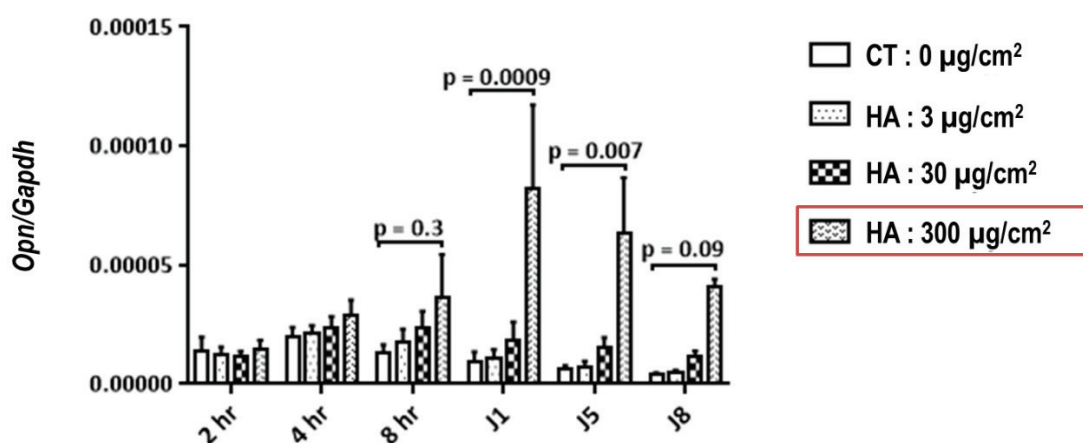


Figure 88 : Expression génique de l'*Opn* dans les MOVAS non traitées (CT) et traitées avec des doses croissantes de cristaux d'hydroxyapatite (HA : 3, 30 et $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) au cours du temps. Les MOVAS ont été mises en culture en absence ou en présence des différentes concentrations de cristaux d'HA. À chaque temps les résultats sont comparés au CT. Les graphes représentent la moyenne \pm l'écart-type de 4 expériences indépendantes. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

3. Effet des cristaux sur la trans-différenciation et l'inflammation des CML

3.1. Effet des cristaux sur l'induction de *Bmp2*

En 2017, des travaux *in-vitro* réalisés au laboratoire ont montré que l'ajout de phosphatase alcaline purifiée dans le milieu de culture des MOVAS, en l'absence de donneur de phosphate, augmentait les niveaux de transcrits de marqueurs ostéo-chondrocytaires, tels que l'aggrécane et l'ostéocalcine, mais aussi de la protéine morphogénique osseuse *Bmp2*²⁹⁹. Ces travaux ont montré que le traitement des CML par des cristaux reproduisait les effets de la phosphatase alcaline sur *Acan* et *Bmp2*, suggérant que la TNAP agissait en générant des cristaux d'apatite. Ces cristaux induiraient ensuite l'expression du facteur ostéogénique *Bmp2*

qui stimulerait la trans-différenciation des CML. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'inhibition des effets de *Bmp2* par ajout de Noggin (inhibiteur de la *Bmp2*) annule les effets de la TNAP en produisant une réduction significative de l'expression d'*Acan*.

Après avoir validé la dose efficace des cristaux d'HA, nous avons donc analysé l'expression génique de *Bmp2* par qPCR. Nous avons remarqué qu'entre 2 et 24 h d'exposition des MOVAS aux cristaux, l'expression génique de *Bmp2* reste faible que ce soit dans les cellules non traitées (CT) ou traitées. Une forte augmentation significative n'est détectée qu'après 5 et 8 jours de traitement, avec respectivement 20 et 39 fois plus d'expression par rapport aux cellules CT (Fig.89). Ce résultat signifie que les cristaux stimulent tardivement la surexpression de *Bmp2*.

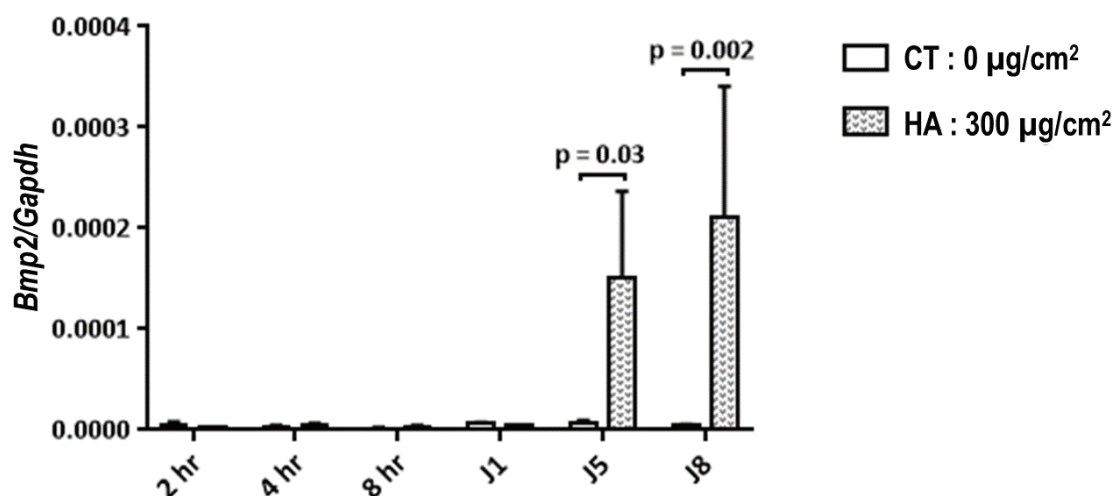


Figure 89 : Expression génique de *Bmp2* dans les MOVAS non traitées (CT) et traitées avec des cristaux d'hydroxyapatite (HA : 300 µg/cm²) au cours du temps. Les graphes représentent la moyenne ± écart-type de 4 expériences indépendantes. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

3.2. Effet indirect des cristaux sur *Bmp2* via *Il-6* et *Tnf-α* ?

Nous avons par la suite cherché le lien entre la stimulation de *Bmp2* et l'inflammation, déjà décrit dans la littérature. Nous avons mesuré par qPCR l'expression de cytokines inflammatoires, telles que *Tnf-α* et *Il-6*. D'un côté, l'expression d'*Il-6* montre une tendance vers la hausse après 4 h d'exposition des MOVAS aux cristaux, avec respectivement 1,2 et 2 fois plus d'expression par rapport aux cellules CT. A partir de 8 h de culture, l'expression d'*Il-6* est extrêmement faible, que ce soit dans les cellules traitées ou dans les cellules CT (Fig.90, A). Il faut néanmoins remarquer qu'une grande variabilité dans l'expression d'*Il-6* est mesurée entre les 4 manipulations réalisées. Il est donc difficile de conclure sur l'effet des cristaux dans ces conditions.

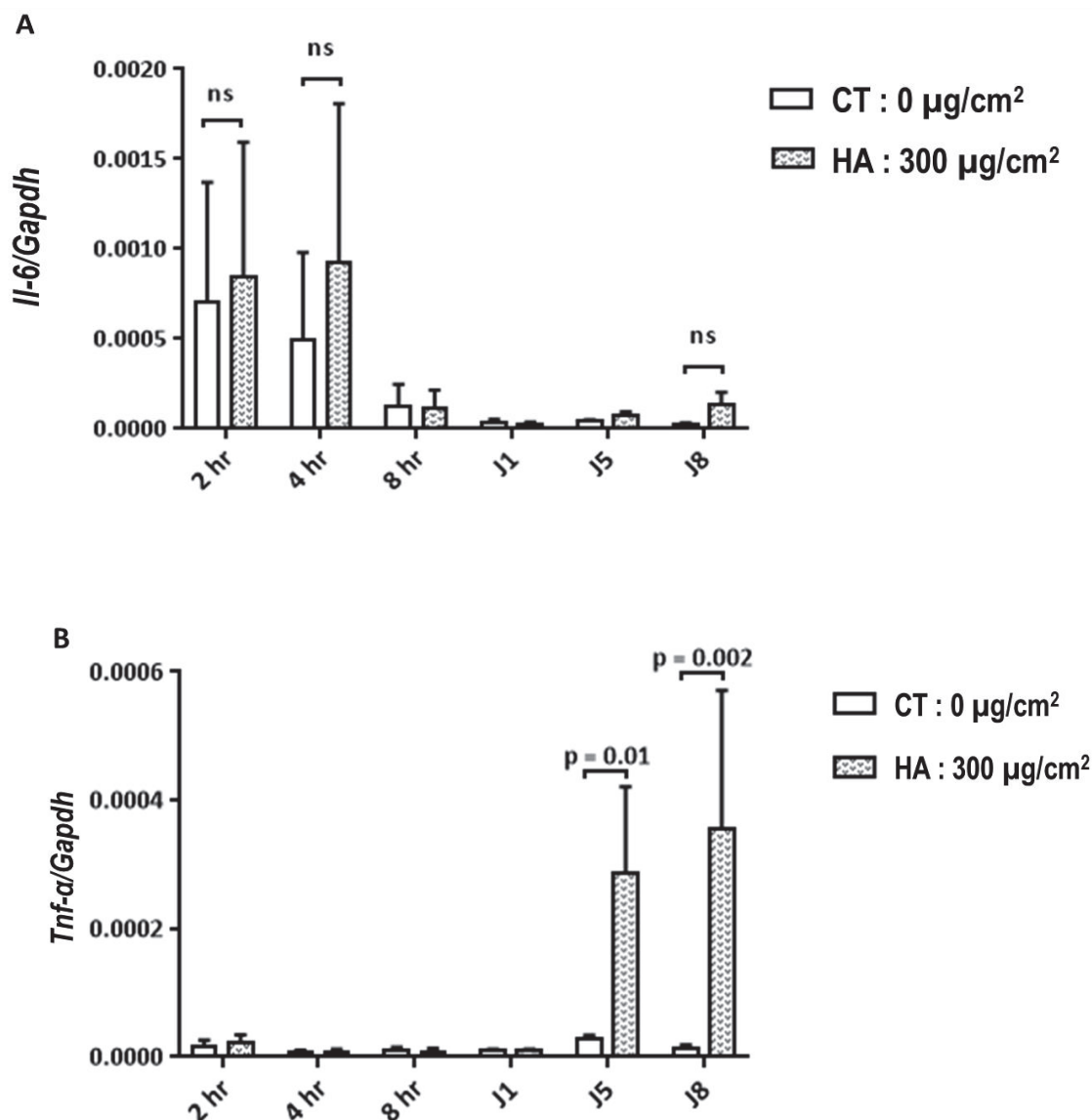


Figure 90 : Expression génique d'Il-6 (A) et de Tnf-α (B) dans les MOVAS non traitées (CT) et traitées avec de cristaux d'hydroxyapatite (HA : 300 µg/cm²) au cours du temps. Les graphes représentent la moyenne ± écart-type de 4 expériences indépendantes. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student. ns: non-significatif.

En revanche, la mesure de l'expression de *Tnf-α* montre une absence presque totale de son expression entre 2 et 24 h dans les MOVAS exposées ou non aux cristaux. Cette absence est suivie d'une forte augmentation après 5 et 8 jours de traitement par les cristaux avec respectivement 10 et 19 fois plus d'expression par rapport aux CT (Fig.90, B). Nous avons remarqué que *Il-6* et le *Tnf-α* montrent deux profils d'expression complètement inversés. Les cristaux stimulent, *Il-6* et *Tnf-α* à des temps précoces et tardifs, respectivement. Il est donc possible que stimulation de l'inflammation par les cristaux médiés par IL-6 joue un rôle précoce, et *Tnf-α* un rôle plus tardif et plus directement lié à l'expression de *Bmp2*.

4. Effet de *Bmp2* sur la trans-différenciation ostéochondrocytaire

4.1. Expression génique de l'*Acan* en réponse aux cristaux

Nous avons ensuite mesuré l'expression de l'*Acan* au cours du temps dans les cellules non traitées et traitées avec de cristaux d'HA. Les résultats obtenus montrent qu'entre 2 et 24 h de traitement son expression reste constante et proche de 0 et est identique en présence ou non de cristaux. En revanche, une forte augmentation significative est détectée après 5 et 8 jours de traitement avec respectivement 24 et 31 fois plus d'expression dans les cellules traitées par rapport aux cellules CT (Fig.91). Nous remarquons que l'*Acan* présente le même profil d'expression que *Bmp2*. Cela pourrait suggérer que *Bmp2* est impliqué dans la trans-différenciation chondrocytaire.

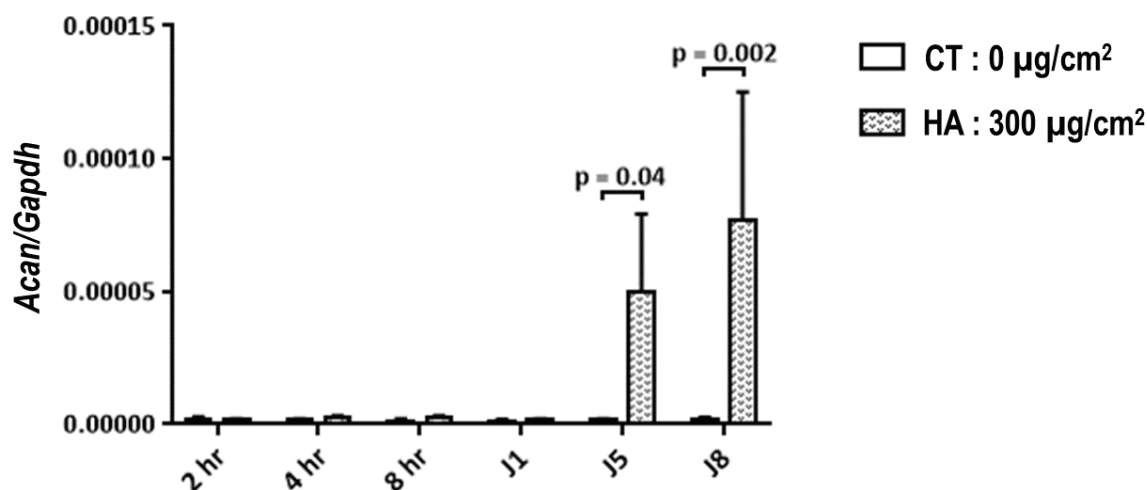


Figure 91 : Expression génique de l'*Acan* dans les MOVAS non traitées (CT) et traitées avec des cristaux d'hydroxyapatite (HA : 300 µg/cm²) au cours du temps. Les graphes représentent la moyenne ± écart-type de 4 expériences indépendantes. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du test-t de Student.

4.2. Expression génique de la *Tnap* en réponse aux cristaux

Des découvertes récentes suggèrent que la *Tnap* peut être activée dans des CML par les cytokines pro-inflammatoires comme *Tnf-α* et les interleukines. Des travaux précédents de l'équipe ont montré que l'ajout de phosphatase alcaline, ou la surexpression de la *Tnap* dans les CML, suffisait à stimuler l'accumulation de calcium de façon significative²⁹⁰, suggérant que la *Tnap* induite dans les CML en conditions inflammatoires suffirait à induire la minéralisation et la trans-différenciation des CML. En 2011, des travaux *in-vitro* ont montré que le *Tnf-α* stimulait la *Tnap* dans les CML humaines³⁶⁵.

Nous avons suivi l'expression de la *Tnap* au cours du temps dans les cellules non traitées ou traitées avec de cristaux d'HA. Malgré le fait que l'expérience n'ait été réalisée qu'une ou 2 fois selon les temps de traitement, il semble y avoir une augmentation après 5 et 8 jours de culture dans les cellules traitées ou non. De plus, nous remarquons une tendance vers la baisse

de l'expression de la *Tnap* dans les cellules traitées avec les cristaux d'HA par rapport aux cellules CT à J5 (diminution de 53 %) et J8 (diminution de 25 %) (Fig.92).

En comparant le profil d'expression de *Tnf- α* avec celui de la *Tnap*, nous avons remarqué, en particulier pour les temps tardifs (J5 et J8), que l'effet des cristaux sur l'expression de la *Tnap* et du *Tnf- α* sont probablement inversement corrélés.

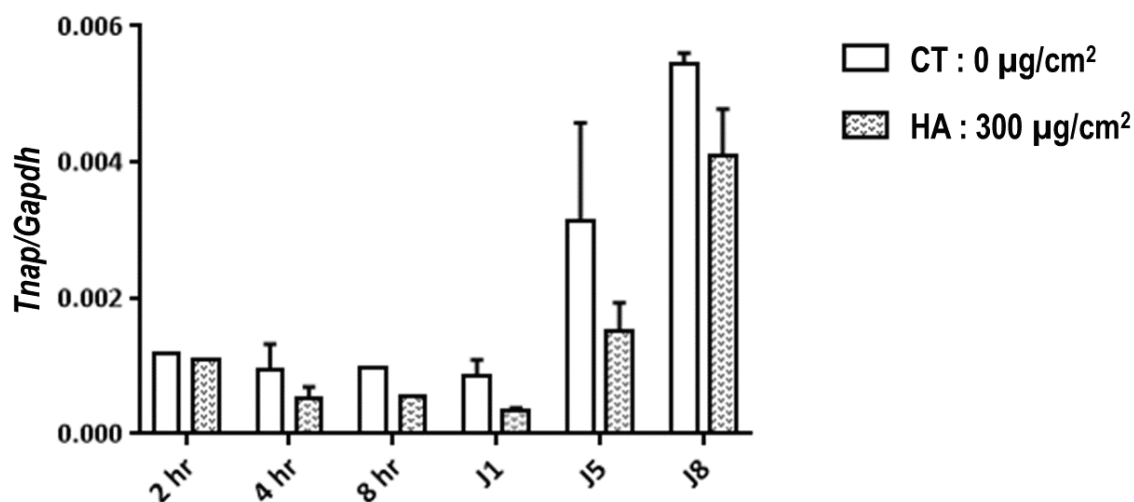


Figure 92 : Expression génique de la *Tnap* dans les MOVAS non traitées (CT) et traitées avec de cristaux d'hydroxyapatite (HA : 300 µg/cm²) au cours du temps. Les graphes représentent la moyenne \pm l'écart-type de 2 expériences indépendantes à 4 h ; 1 ; 5 et 8 jours de traitement et les valeurs d'1 seule expérience à 2 et 8 h de traitement.

4.3. Expression génique de *Sox9* et *Runx2* en réponse aux cristaux

Puisque les MOVAS expriment des marqueurs ostéo-chondrocytaires en réponse aux cristaux, nous avons logiquement supposé que les facteurs de transcription responsables de l'induction de ces marqueurs étaient aussi exprimés. Nous avons donc mesuré par qPCR l'expression des deux principaux facteurs de transcription *Sox9* et *Runx2*. *Sox9* un facteur de transcription qui contrôle l'*Acan*, et *Runx2* un facteur de transcription qui contrôle la *Tnap*. Les résultats préliminaires obtenus semblent suggérer que ces deux facteurs (*Sox9* et *Runx2*) sont surexprimés après 2 et 4 h de traitement dans les cellules traitées par rapport aux cellules CT, et même encore après 8 h pour *Runx2*, puis se stabilisent jusqu'à J8 à un niveau d'expression comparable aux cellules CT (Fig.93). Ces valeurs suggèrent que l'expression précoce des facteurs de transcription pourrait être responsable de l'expression tardive des marqueurs ostéo-chondrocytaires.

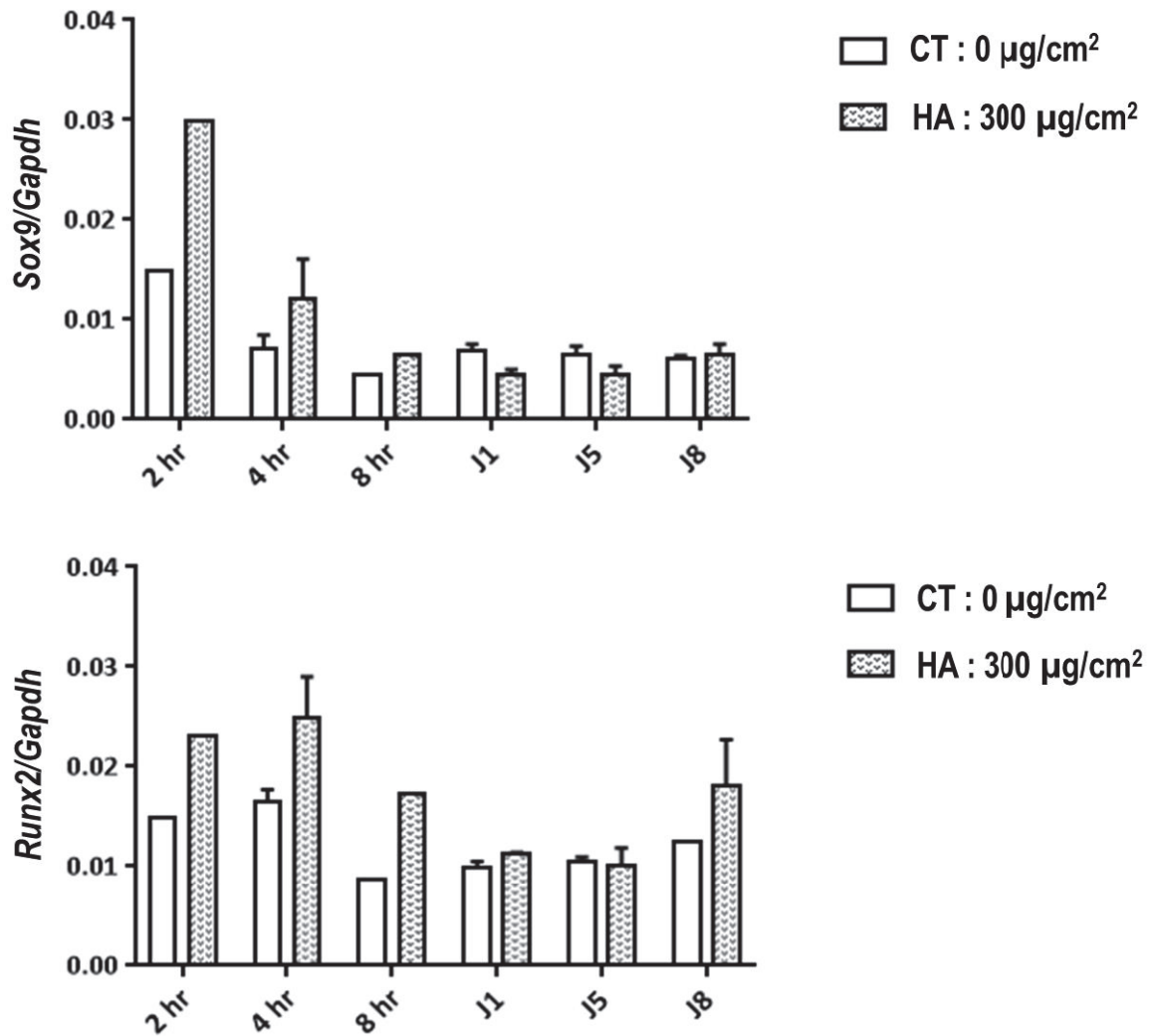


Figure 93 : Expression génique de Sox9 et de Runx2 dans les MOVAS non traitées (CT) et traitées avec de cristaux d’hydroxyapatite (HA : 300 µg/cm²) au cours du temps. Les graphes représentent la moyenne ± l’écart-type de 2 expériences indépendantes à 4 h ; 1, 5 et 8 jours de traitements et les valeurs d’1 seule expérience à 2 et 8 h de traitement.

L’ensemble de ces résultats nous a permis de montrer que les cristaux d’hydroxyapatite stimulent tardivement la surexpression de *Bmp2*, du *Tnf-α*, mais par contre ne stimulent pas l’*Il-6*. Il est donc probable que l’effet des cristaux sur *Bmp2* ne sera pas médié par des facteurs inflammatoires. Ces expériences très préliminaires doivent être répétées plusieurs fois pour y voir plus clair et privilégier une nouvelle voie de recherche plutôt qu’une autre.



Discussion

1. Rappel du contexte

1.1. Calcifications athéroscléreuses

En ce qui concerne l'impact des calcifications sur la stabilité des plaques, la situation est assez controversée, entre l'implication des microcalcifications comme prédictrices et contributrices de la morbidité et la mortalité cardiovasculaires et des macrocalcifications comme stabilisatrices des plaques athéroscléreuses. En effet, des preuves histopathologiques suggèrent que les microcalcifications sont probablement plus dangereuses, car elles peuvent exacerber l'inflammation et déclencher la rupture de la plaque^{236,238,237,366}. Bien que les microcalcifications soient présumées dangereuses, nous ne savons pas comment elles se forment et aucune étude n'a à ce jour réussi à bloquer leur formation spécifiquement. Nous avons cherché dans la littérature à mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'initiation de ces derniers dans les plaques. Certaines études ont mis la lumière sur l'implication de la transdifférenciation ostéochondrocytaire. Les CML sous l'influence de nombreux facteurs (inflammation, stress oxydatif) peuvent subir des changements phénotypiques pour se transformer en cellules de type ostéochondrocytaire et initier la calcification^{265,161,162}. D'un autre côté, d'autres études ont mis en évidence les débris apoptotiques, les vésicules extracellulaires et l'activité TNAP comme initiateurs possibles de ce processus, indépendamment de la trans-différenciation ostéochondrocytaire^{118,213,254,367,368,368,258}.

1.2. TNAP et calcifications athéroscléreuses

Mon travail de thèse s'est articulé autour de plusieurs objectifs dans le but de valider expérimentalement le rôle de la TNAP, la principale enzyme impliquée dans la minéralisation osseuse, dans la calcification et la progression des plaques athéroscléreuses. Dans la littérature, il est suggéré que la TNAP locale précède et stimule les calcifications dans les plaques athéroscléreuses chez des souris ApoE^{-/-}²⁴². De plus, la TNAP circulante d'origine hépatique est associée au syndrome métabolique^{369,370,371}, aux calcifications des artères coronaires et à la mortalité cardiovasculaire³⁷². En premier lieu, nous avons cherché à explorer l'expression de la TNAP dans les plaques athéroscléreuses chez des souris ApoE^{-/-} âgées de 17 à 31 semaines. Dans ce contexte, nous avons choisi de déterminer précisément quand apparaissent la TNAP, les microcalcifications, ainsi que l'inflammation et la transdifférenciation ostéochondrocytaire. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à explorer l'effet de l'inhibition de la TNAP via l'inhibiteur SBI-425 sur la calcification et la progression des plaques chez des souris ApoE^{-/-} traitées de 10 semaines à 25 ou 31 semaines. Dans ce contexte, nous avons suivi les calcifications, l'inflammation, la transdifférenciation ostéochondrocytaire et l'accumulation de lipides.

2. Synthèse des résultats tâche 1

2.1. Calcifications des plaques dans les souris ApoE^{-/-}

Dans le contexte rappelé précédemment, mes travaux de thèse ont consisté à explorer dans un modèle murin de souris ApoE^{-/-} athéroscléreuses les mécanismes de formation des calcifications et de progression des plaques, avant de s'attacher à l'étude de l'inhibition de la TNAP. Dans un premier temps pour déterminer avec précision comment la calcification progresse dans les plaques murines, nous avons d'abord caractérisé le développement des plaques chez les souris ApoE^{-/-} sacrifiées toutes les deux semaines de 17 à 31 semaines dans une cohorte d'étude *ex-vivo*. Nous avons analysé les plaques athéroscléreuses de 72 souris ApoE^{-/-} âgées de 6 semaines nourries par un régime riche en graisses. Nos résultats indiquent une augmentation du nombre et d'étendue des plaques avec une perte des cœurs lipidiques au cours du temps (Fig.53, 54). Dans un deuxième temps et en accord avec la littérature existante²⁴², nous avons montré par l'imagerie basée sur l'OS que les calcifications précoces (taille ~ 10 µm) apparaissent d'abord dans l'arche aortique entre 19 et 21 semaines et sont suivies par des calcifications dans d'autres artères telles que la carotide commune gauche (Fig.57). De plus nous avons montré par coloration oil red O et bleu alcian *ex-vivo* que les calcifications formées progressent au sein d'une métaplasie cartilagineuse, proche d'abord mais ensuite distincte des dépôts lipidiques (Fig.68). Ces résultats sont en accord avec la littérature, en particulier avec les deux études de Rattazi et al publié en 2005 et celle de Rosenfeld ME publié en 2000^{265,373}. De plus, nos résultats indiquent que ces régions cartilagineuses calcifiées se sont développées et, chez certaines souris, ont finalement fusionné pour occuper la totalité de l'arche aortique. En parallèle de ces études, nous avons établi une collaboration avec le centre d'imagerie de Lyon (Cermep), afin de pouvoir utiliser la ¹⁸F-NaF-µPET/µCT pour suivre longitudinalement la calcification chez les souris ApoE^{-/-}. *in-vivo*, les calcifications sont imagées par CT scan et µTEP à 19, 25, 31 et 34 semaines. Les résultats obtenus par µCT, montrent l'évolution progressive du volume calcique dans les plaques qui commence entre 19 et 25 semaines, pour être détectable à la semaine 25, et qui ensuite s'intensifie jusqu'à la semaine 34 (Fig.64, B). Ces données suggèrent que le dépôt de calcium commence précocement et s'accumule ensuite au cours du temps. De son côté, la µTEP n'a détecté aucun signal entre 19 et 25 semaines, avant que le signal ne progresse de façon importante entre 25 et 34 semaines, pour stagner enfin entre 31 et 34 semaines (Fig.64, C). Ces données suggèrent que même si l'activité de calcification augmente rapidement dans les stades précoces, elle ne progresse plus dans les stades tardifs bien qu'elle reste toujours présente. Par contre le volume des calcifications augmente tout au long de l'étude, ce qui confirme logiquement la quantification histologique que nous avons obtenue *ex-vivo* concernant la surface moyenne des calcifications (Fig.57, B).

2.2. Inflammation et calcification

Un paradigme émergent suggère que les calcifications précoces qui se forment dans les plaques sont pro-inflammatoires et mécaniquement nocives^{374,375,360}. L'inflammation est un moteur reconnu de la calcification des plaques²⁴¹, mais on peut donc se demander de l'inflammation ou de la calcification, laquelle est la poule et laquelle est l'œuf³⁷⁶.

Au cours de ma thèse, nous avons analysé par immunohistochimie les plaques athéroscléreuses de 72 souris ApoE^{-/-}, nous avons systématiquement observé que les macrophages sont beaucoup plus présents dans les plaques sans calcification ou avec des calcifications précoces, que dans les plaques avec des calcifications avancées (Fig.70), confirmant l'étude d'Elena Aikawa et al de 2007. Rapidement après leur formation, les calcifications se développent au sein d'une métaplasie cartilagineuse apparemment dépourvue des cellules inflammatoires. Cette séparation progressive entre inflammation et calcification semble validée par le fait que les niveaux des marqueurs inflammatoires (*Tnf- α* , *Il-1 β* et *Il-6*) dans les aortes abdominales des souris ApoE^{-/-} sont significativement associés aux marqueurs chondrocytaires (*Runx2* et *Sox9*) entre 17 et 21 semaines (stades précoces), mais cette association est perdue entre 27 et 31 semaines (stades tardives) (Fig.71, 72, 73). Ceci confirme l'idée qu'au fur et à mesure que les calcifications précoces progressent dans la métaplasie cartilagineuse, elles seront moins associées à des cellules inflammatoires. En effet, nous avons observé que l'activité de calcification mesurée par μ TEP dans l'aorte est positivement corrélée avec les niveaux de marqueurs inflammatoires et chondrocytaires, mais pas le volume de calcium mesuré par μ CT. L'ensemble de ces résultats nous permet de suggérer que l'inflammation est la poule et les calcifications les œufs.

Les CML dans les plaques athéroscléreuses ont la capacité de se transdifférencier en cellules de type ostéochondrocytaire²⁶⁵. Un certain nombre de données suggèrent que les cytokines inflammatoires stimulent la transdifférenciation des CML en chondrocytes, qui alors mûrissent en chondrocytes hypertrophiques exprimant *Runx2* pour induire la calcification, en raison de leur activité TNAP^{161,377,378,250}. Après l'étude initiale de Tintut et Demer selon laquelle le TNF- α stimule les CML à exprimer la TNAP et ainsi à minéraliser³⁷⁷, plusieurs articles ont confirmé que les cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , mais aussi l'IL-1 β et l'IL-6, stimulent la calcification dans les CML en culture²⁵⁰. Le TNF- α active la transdifférenciation des CML en cellules de type ostéochondrocytaires, exprimant *Runx2* et plusieurs marqueurs de cellules minéralisantes³⁷⁹. Étant donné que les macrophages stimulent la minéralisation des CML en partie via le TNF- α in-vitro, il est probable que les CML des plaques athéroscléreuses soient stimulées pour calcifier par le TNF- α libéré par les macrophages (décrite p.47-48 de l'introduction). A l'opposé, les mécanismes cellulaires responsables de la calcification des plaques humaines apparaissent plus complexes. L'ossification de la plaque se produit dans les artères périphériques mais beaucoup moins dans les artères coronaires ou les carotides^{205,215}, et repose probablement sur des mécanismes intramembranaires (sans matrice cartilagineuse), plutôt que sur des mécanismes endochondraux (avec matrice cartilagineuse)²⁷⁰. De plus, dans les artères coronaires, l'expression des marqueurs ostéochondrocytaires semble se produire après la microcalcification, suggérant que la transdifférenciation des CML est une conséquence et non une cause de la formation des microcalcifications^{243,275}. Néanmoins, les données provenant de l'homme suggèrent que l'inflammation active les CML pour modifier leur phénotype entraînant une induction de la minéralisation, sans les transdifférencier en véritables chondrocytes ou ostéoblastes.

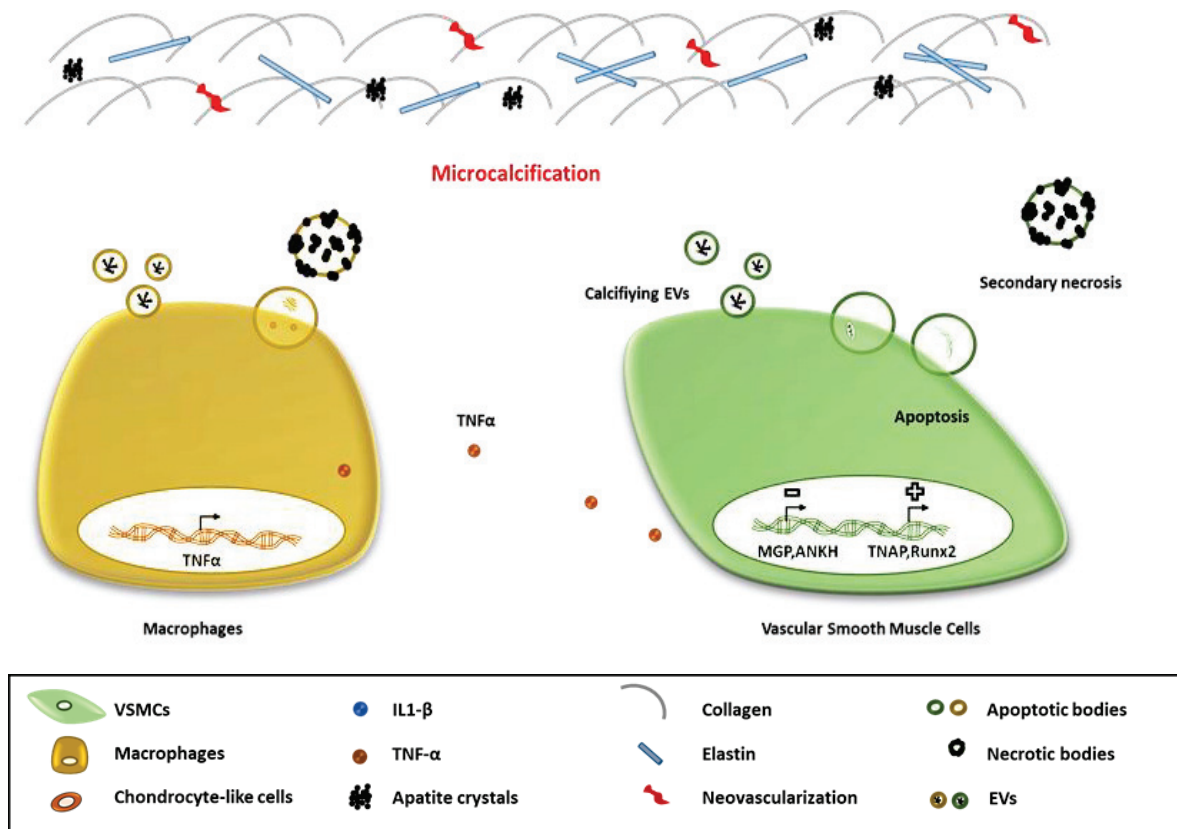


Figure 94 : Inflammation et microcalcifications dans le contexte artérioscléreux.

2.3. Implication de la TNAP dans la calcification de plaque

Dans la littérature la TNAP est décrite comme probablement le principal suspect dans la calcification des plaques athéroscléreuses²⁸⁷. Par conséquent, dans le but de valider expérimentalement son rôle, nous avons analysé les plaques athéroscléreuses de 72 souris ApoE^{-/-} après coloration au BCIP/NBT (Fig.55). Nos résultats indiquent que l'activité locale de la TNAP est mise en évidence sur des coupes d'arches aortiques de souris ApoE^{-/-} âgées entre 17 et 19 semaines, à un âge auquel aucune calcification n'est détectée. De plus, nous avons observé que lorsque les calcifications sont détectées, elles sont systématiquement associées à l'activité locale de la TNAP (Fig.58, 59). L'ensemble de ces résultats suggèraient que la TNAP est localement impliquée, en précédant les calcifications, auxquelles elle est ensuite toujours associée dans les plaques athéroscléreuses des souris ApoE^{-/-}.

Deux études publiées dans la dernière décennie ont montré que la suppression de Runx2 dans les CML des souris Ldlr^{-/-} ou ApoE^{-/-} réduit significativement la minéralisation^{287,162}. D'un côté, dans notre étude, nous avons observé que l'expression génique de la TNAP dans les aortes abdominales des souris ApoE^{-/-} est fortement associée à l'expression de *Runx2*, suggérant que les cellules qui expriment la TNAP sont des chondrocytes trans-différenciés à partir des CML. D'un autre côté, en collaboration avec le Dr Thibaut Quillard à Nantes, nous avons confirmé ces données chez l'homme, où la TNAP est exprimée à la périphérie proximale des calcifications dans les plaques carotidiennes humaines calcifiées, à la fois dans les cellules

qui expriment ou non RUNX2. Dans les plaques humaines comme dans les plaques des souris ApoE^{-/-}, la TNAP précède les calcifications. En conclusion de cette première partie, nous avons confirmé les résultats de la littérature concernant le développement des calcifications, mais, nous nous avons caractérisé plus précisément la calcification dans les plaques précoces et les plaques tardives chez des souris ApoE^{-/-} âgées de 17 à 31 semaines, alors que dans la littérature la caractérisation était limitée sur un ou deux temps précoces ou tardifs²⁶⁵.

2.4. La TNAP hépatique participe-t-elle aux calcifications athéroscléreuses ?

La littérature abonde d'études décrivant la relation entre le foie, le syndrome métabolique (Mets), la TNAP circulante ainsi que la mortalité cardiovasculaire^{380,369,370,371}. Ces études suggèrent que la TNAP circulante d'origine hépatique pourrait affecter la mortalité cardiovasculaire en stimulant depuis la circulation sanguine la calcification des plaques. Cette hypothèse était renforcée par le fait qu'un déficit d'origine génétique de production de PPI dans le sang conduit au développement de calcifications vasculaires dans les maladies GACI (*Generalized Arterial Calcification of Infancy*) et pseudoxanthoma elasticum^{391,392}. Or, pendant mon travail de thèse, nous avons observé que l'activité de la TNAP sérique était relativement constante entre 17 et 31 semaines chez les souris ApoE^{-/-} (Fig.61). De plus, l'augmentation de l'expression de la TNAP dans le foie a eu lieu entre 21 et 25 semaines (Fig.62, A), à un moment où les calcifications vasculaires grossissaient le moins vite. En conséquence, nos expériences semblent exclure la possibilité que la TNAP circulante contribue à la calcification des plaques athéroscléreuses. Cela suggère que la TNAP du foie n'est pas impliquée et que la calcification de la plaque chez les souris ApoE^{-/-} repose principalement sur l'activité de la TNAP exprimée localement.

Dans notre étude, nous avons noté une association entre l'expression de la TNAP dans le foie et l'expression de marqueurs de fibrose hépatique (*Tgf-β* et *Col1a2*) (Fig.63). Nous sommes conscients que nous n'avons pas réalisé assez d'analyses pour suggérer que la TNAP hépatique est exprimée pendant la phase de fibrose, mais des études récentes suggèrent que la TNAP hépatique est activée par un régime riche en gras, et en particulier pendant la fibrose^{381,382}. Nous n'avons malheureusement pas prévu de fixer des échantillons de foie afin d'explorer la fibrose hépatique dans la tâche de caractérisation des calcifications, mais nous avons allons très prochainement mesurer la quantité d'hydroxyproline dans nos échantillons de foie pour conforter l'hypothèse que la TNAP est exprimée en lien avec la fibrose. Enfin, que la TNAP soit exprimée pendant la fibrose ou non, sa fonction hépatique reste pour le moins obscure. L'étude récente qui a lié la TNAP à la fibrose a sur la base des résultats obtenu proposé que la TNAP est activée pour déphosphorer et détoxifier le LPS ayant traversé la barrière intestinale. Comme nous le discuterons plus loin, nous n'avons quant à nous pas pu mettre en évidence cette fonction.

3. Synthèse des résultats tâche 2

3.1. Effets de l'inhibition de la TNAP par l'inhibiteur SBI-425

Après avoir observé que la TNAP est localement associée aux microcalcifications, nous avons étudié les effets de son inhibition chez les souris ApoE^{-/-}.

En 2015, le groupe de Jose Luis Millan a développé le 5-((5-chloro-2-méthoxyphényl) sulfonamide) nicotinamide, ou SBI-425, en tant qu'inhibiteur puissant et hautement sélectif de la TNAP, adapté aux expériences *in-vivo*³⁵⁹. Cet inhibiteur a d'abord été validé chez les souris surexprimant la TNAP sous le contrôle du promoteur Tagln actif dans les CML³⁸³. Ces souris développent une calcification artérielle étendue, une fibrose et une hypertrophie du ventricule gauche, une pression artérielle systolique plus élevée et une mortalité précoce et soudaine, compatible avec une évolution vers une insuffisance cardiaque. Les souris qui ont reçu par voie orale ou intraveineuse une dose de 10 mg/kg/jour de l'inhibiteur SBI-425 ont montré une inhibition complète de l'activité TNAP plasmatique avec une diminution des calcifications et une durée de vie prolongée³⁸³.

Dans une étude plus récente publiée par Li Q et al en 2019, le SBI-425 a également réduit la minéralisation ectopique observée dans la peau des souris dans le modèle murin de pseudoxanthome élastique³⁸⁴ et empêché la calcification vasculaire dans le cas d'une insuffisance rénale chronique (IRC) induite chez la souris par une alimentation riche en adénine et phosphate³⁸⁵. Ces résultats indiquent que l'inhibition de la TNAP par le SBI-425 peut représenter une stratégie prometteuse pour traiter certaines des complications développées par les patients atteints d'IRC.

À ce jour, un seul article a rapporté les effets du SBI-425 sur la calcification de la plaque athéroscléreuse, mais dans un modèle très artificiel, un modèle murin d'hypercholestérolémie familiale (souris Ldlr^{-/-} présentant une mutation ponctuelle du récepteur des lipoprotéines de basse densité) croisées avec des souris surexprimant la TNAP dans les cellules endothéliales, ce qui rend l'étude plus complexe et les résultats plus difficiles à interpréter. La supplémentation orale du SBI-425 à une dose de 30 mg/kg/jour dans ce modèle murin a conduit à une diminution de l'accumulation de calcium dans les artères coronaires³⁴⁷. Ces résultats suggèrent que le SBI-425 peut inhiber la calcification de la plaque athéroscléreuse en plus de son rôle sur l'inhibition de la calcification médiale associée à l'IRC.

3.2. Effets du SBI-425 dans les souris ApoE^{-/-}

Dans ce contexte, nous avons cherché à avoir une vision plus claire des effets du SBI-425 sur la calcification de la plaque athéroscléreuse. Notre étude est la première à montrer ses effets dans le modèle d'athérosclérose induite chez la souris déficiente en ApoE (ApoE^{-/-}). Nous avons tout d'abord observé que l'administration orale de 30 mg/kg/jour de SBI-425 dans une nourriture riche en graisses pendant 48 h chez les souris C57BL/6 inhibe de 83 % l'activité spécifique de la TNAP plasmatique (Fig.74). Cette forte inhibition a validé dans notre laboratoire et avec notre lot d'inhibiteur l'efficacité du SBI-425 administré par voie orale sur l'activité enzymatique de la TNAP circulante.

Nous avons donc soumis les souris ApoE^{-/-} à un régime riche en graisses (HFD) en absence (souris CT) ou en présence de SBI-425 (souris SBI) à une dose orale de 30 mg/kg/jour. En nous basant sur les résultats obtenus dans la première tâche, nous avons choisi de commencer l'inhibition de la TNAP à partir de la semaine 10, jusqu'à la semaine 25 [caractérisée par des calcifications précoces (microcalcifications)] avec 26 souris ApoE^{-/-}, séparées en 13 souris CT et 13 souris SBI, ainsi que de la semaine 10 à la semaine 31 [caractérisée par des calcifications avancées (macrocalcifications)], avec aussi 26 souris ApoE^{-/-} séparées en 13 souris CT et 13 souris SBI.

Nous avons observé que l'administration de SBI-425 entraîne une inhibition de 30,9 % à la semaine 25 et de 32,5 % à la semaine 31 de l'activité spécifique de la TNAP sérique chez les souris ApoE^{-/-}, bien que cette diminution n'atteigne pas la significativité dans les 2 groupes de souris SBI par rapport aux souris contrôle (Fig.76). Ces différences observées sur le pourcentage d'inhibition de l'activité TNAP entre les groupes de souris C57BL/6 et les groupes de souris ApoE^{-/-} proviennent vraisemblablement du fait que les souris C57BL/6 n'avaient pas été mises à jeun la veille du sacrifice, contrairement aux souris ApoE^{-/-}, ce qui avait permis de maintenir un taux élevé de SBI-425 dans le sang des souris C57BL/6.

Nous n'avons remarqué aucun effet significatif du SBI sur la mortalité, les signes cliniques, la différence de poids et la prise alimentaire des souris ApoE^{-/-} tout au long de l'étude (Fig.75). De plus, même lors de l'administration du SBI à long terme, jusqu'à la semaine 31, nous n'avons trouvé aucun effet du SBI sur l'architecture osseuse (Fig.77). Il est possible que ceci puisse être dû à la faible capacité du SBI à pénétrer dans les tissus en raison de sa structure³⁵⁹. Il est aussi possible que les souris ApoE^{-/-} adultes ont un remodelage et une formation osseuse réduites, et peu affectées par l'inhibition de la TNAP. Soulignons enfin qu'il a été récemment montré que si une administration pendant plusieurs semaines de SBI-425 n'affecte pas l'architecture osseuse, telle que déterminée par μ CT, une analyse histologique plus fine du tissu osseux a montré un épaississement du tissu ostéoïde³⁸⁶. Ces données indiquent donc que la minéralisation osseuse est bien inhibée par le SBI-425 chez les rongeurs, mais souvent sans impacter significativement l'architecture osseuse, au moins avec les durées de traitements réalisés à ce jour.

3.3. Inhibition de la TNAP de 10 à 25 semaines

A l'issue de la première période d'inhibition de la TNAP par le SBI, pendant 15 semaines nous avons utilisé les mêmes méthodes d'analyse que décrites dans la tâche 1 afin d'étudier l'effet de l'inhibition de la TNAP sur la formation des calcifications dans les plaques athéroscléreuses des souris ApoE^{-/-} à court terme. Tout d'abord, nous avons observé que le volume des calcifications détectés par μ CT indiquent que 6 souris parmi les 11 souris CT présentent des calcifications, alors qu'aucun signal n'a pu être quantifié dans les 12 souris SBI à la semaine 25 (Fig.78, A). De même, la μ TEP a révélé l'absence de signal, donc de calcification active, pour les souris SBI par rapport aux souris CT (Fig.78, B). Ces résultats nous ont permis de conclure que l'inhibition de la TNAP prévient la formation des calcifications des plaques.

Ensuite, étant donné que les méthodes *ex-vivo* utilisées dans la tâche 1 avaient montré plus de sensibilité que les méthodes d'imagerie *in vivo*, nous avons recherché plus précisément les calcifications dans les coupes d'arches aortiques de 26 souris ApoE^{-/-} (13 souris CT et 13 souris SBI) nourries avec un régime riche en graisses. Nos résultats indiquent que l'ensemble de 13 souris CT présentent des calcifications alors que parmi les 13 souris SBI, seules 9 souris en présentent (Fig.79). Ces résultats confirment ce que nous avons obtenu *in-vivo*, montrant chez les souris SBI une diminution significative du nombre des calcifications précoces à la semaine 25. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le SBI ne prévient pas totalement la formation des calcifications précoces, mais les ralentit considérablement.

En plus de ralentir la calcification de la plaque, l'inhibition de la TNAP a également réduit l'inflammation de la plaque. Étant donné que les microcalcifications sont vraisemblablement proinflammatoires²³², il est possible de conclure que la prévention de la calcification de plaque était la cause de la réduction de l'inflammation de la plaque. Cependant, nous pensons plutôt que l'inhibition de la TNAP a principalement diminué l'inflammation de la plaque en réduisant les niveaux de lipides sériques et en altérant le développement des plaques athéroscléreuses. Nous avons ensuite étudié l'effet du SBI-425 sur le développement des plaques. Tout d'abord, nous avons mesuré la surface des plaques athéroscléreuses des 26 souris ApoE^{-/-} (CT et SBI). Les mesures obtenues révèlent une diminution significative de la surface des plaques des souris SBI par rapport aux souris CT (Fig.85, suggérant que l'inhibition de la TNAP à court terme réduit la croissance des plaques. En complément et pour confirmer ces résultats, nous avons mesuré le taux de triglycérides et de cholestérol sérique des 26 souris ApoE^{-/-} (CT et SBI). Nos résultats montrent une diminution significative du taux de triglycérides et de cholestérol sérique chez les souris SBI par rapport aux souris CT, à la semaine 25 (Fig.86). Étant donné que chez les souris ApoE^{-/-} le cholestérol circulant est essentiellement transporté dans les VLDL d'origine hépatique, ces résultats nous permettent de faire l'hypothèse que l'inhibition de la TNAP a réduit le développement des plaques en agissant sur le foie pour réduire la libération du cholestérol.

Il sera donc important de continuer nos recherches au niveau du foie dans le but d'explorer les effets de l'inhibition de la TNAP. Les résultats acquis au laboratoire à ce jour suggèrent que la TNAP pourrait participer au transport des lipides à travers le foie en déphosphorylant la phosphocholine (voir article en annexe), mais ces résultats doivent être confortés.

3.4. Inhibition de la TNAP de 10 à 31 semaines

Enfin, à l'issue de la première période d'inhibition de la TNAP par le SBI à court terme, nous avons utilisé les mêmes méthodes d'analyse que décrites précédemment, mais cette fois afin d'étudier l'effet de l'inhibition de la TNAP sur la formation des calcifications plus avancées dans les plaques athéroscléreuses des souris ApoE^{-/-} à long terme. Nous avons observé *in-vivo* par CT scan que lors d'un traitement plus long jusqu'à 31 semaines, les calcifications sont visibles chez les souris CT et SBI, avec des volumes calculés, statistiquement non différents. Comme observé par μ CT, nous avons détecté des signaux μ TEP à la fois chez les souris CT et

les souris SBI à la semaine 31, d'intensités statistiquement non différentes (Fig.78). Ces résultats suggèrent que le SBI-425 limite la survenue des calcifications précoces mais n'agit plus sur la croissance des calcifications plus avancées. Nous avons observé *ex-vivo* par l'OS que le nombre de calcification montre une diminution significative à la semaine 31, avec entre 2 et 6 calcifications pour les souris CT et entre 0 et 3 pour les souris SBI (Fig.79, B). Mais par contre, inversement à la réduction significative du nombre de calcifications observées, nous avons mesuré une augmentation significative de la surface moyenne des calcifications chez les souris SBI traitées à court et long terme par rapport aux souris CT (Fig.80). Ceci semble suggérer que les microcalcifications qui ont pu se former malgré la présence du SBI ont vu ensuite leur taille augmenter de façon plus importante. En complément à la semaine 25, nous avons mesuré l'expression génique des marqueurs ostéochondrocytaires dans le but de mettre en évidence la métaplasie cartilagineuse à long terme. Fait intéressant, nous avons remarqué une forte augmentation significative dans l'expression génique de *Sox9*, *Acan* et *Runx2* chez les souris SBI âgées de 31 semaines par rapport aux souris SBI âgées de 25 semaines (Fig.84). Ces résultats indiquent que le SBI accélère la formation du cartilage à long terme, dans les plaques tardives, suggérant que l'augmentation de la calcification menée par la prolongation de l'inhibition de la TNAP de 25 à 31 semaines, était en outre due à la différenciation accrue en cellules de type ostéochondrocyte. Il sera intéressant de se poser la question de savoir si cette formation de cartilage à long terme stabilise ou déstabilise les plaques?

Nous avons mesuré l'expression génique des marqueurs pro-inflammatoires tels que *Cd68*, *Il6* et *Il8* (Fig.82). Inversement aux résultats obtenus à la semaine 25, nous avons observé une stimulation de l'inflammation dans les plaques à la semaine 31 (Fig.83). L'ensemble de ces résultats suggère que l'inflammation est réduite lors du traitement des souris par le SBI, uniquement dans les stades précoces, lors de la formation des premières calcifications, alors qu'elle est stimulée dans les stades tardifs. Cette augmentation de l'inflammation tardive joue-t-elle un rôle uniquement négatif, ou bien peut-être un rôle protecteur ? Une étude récente a effectivement montré que l'IL-1 β joue un rôle protecteur dans les plaques avancées chez la souris¹⁴⁸.

Finalement, nous avons mesuré l'effet de l'inhibition de la TNAP à long terme sur le développement des plaques ainsi que sur l'accumulation des lipides sériques. Les mesures obtenues révèlent une équivalence de la surface des plaques entre les souris CT et les souris SBI (Fig.85). Ceci suggère, que l'inhibition à long terme ne permet plus la réduction des plaques mais au contraire semble entraîner une croissance accélérée. D'un autre côté, nous avons remarqué une hausse du taux de cholestérol sérique chez les souris SBI âgées de 31 semaines par rapport aux souris SBI âgées de 25 semaines (Fig.86). Ceci suggère que l'effet bénéfique du SBI à court terme sur le foie (semaine 25) est perdu lorsque le traitement est prolongé jusqu'à la semaine 31.

A ce stade, nous ne savons pas quelles sont les raisons de ces différences d'effets hépatiques à 25 et 31 semaines. Nos analyses effectuées à ce jour sur le foie ne montrent pas

vraiment de toxicité du SBI-425, que ce soit sur l'inflammation, la stéatose, ou la fibrose hépatique. Même des analyses de métabolomique n'ont pas permis de mettre en évidence de métabolites dont les niveaux hépatiques sont significativement impactés par l'inhibition de la TNAP. Il reste donc encore beaucoup d'efforts et de travail à accomplir pour mieux comprendre les fonctions hépatiques de la TNAP et l'impact de son inhibition.



Conclusion

Conclusion

Dans notre étude, nous rapportons que l'inhibition de la TNAP avec le SBI-425 a amélioré l'athérosclérose chez les souris ApoE^{-/-}, avec une réduction de la taille de la plaque, de l'inflammation, et de la calcification. Le SBI a probablement agi en partie en inhibant la TNAP dans les plaques et en ralentissant les calcifications, et également en inhibant la TNAP dans le foie et en réduisant le cholestérol sanguin. Le fait que l'inhibition de la TNAP exerce apparemment des effets bénéfiques chez la souris, ouvre des perspectives sur ses applications au niveau humain. Dans notre étude, l'administration de SBI aux souris ApoE^{-/-} pendant plusieurs mois, n'a pas produit d'effets secondaires sur l'architecture osseuse, la mortalité, le poids, le métabolisme, ou l'inflammation systémique. Nous attendons donc avec impatience les résultats des premiers essais cliniques utilisant le SBI-425 pour voir s'il est également bien toléré chez l'homme et bloque bien les calcifications vasculaires

Références bibliographiques

1. Benjamin, E. J. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics'2017 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation* vol. 135 (2017).
2. Fernández-Friera, L. *et al.* Prevalence, vascular distribution, and multiterritorial extent of subclinical atherosclerosis in a middle-aged cohort the PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) study. *Circulation* **131**, 2104–2113 (2015).
3. Libby, P. Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2004–2013 (2013).
4. Wilkins, E. *et al.* European Cardiovascular Disease Statistics 2017, European Heart Network, Brussels. *Eur. Cardiovasc. Dis. Stat.* **34**, 3028–3034 (2017).
5. Libby, P. *et al.* Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **5**, 1–18 (2019).
6. Hawkins, R. A. *et al.* Evaluation of the skeletal kinetics of fluorine-18-fluoride ion with PET. *J. Nucl. Med.* **33**, 633–642 (1992).
7. Grant, F. D. *et al.* Skeletal PET with 18F-fluoride: Applying new technology to an old tracer. *J. Nucl. Med.* **49**, 68–78 (2008).
8. Derlin, T. *et al.* Feasibility of 18F-sodium fluoride PET/CT for imaging of atherosclerotic plaque. *J. Nucl. Med.* **51**, 862–865 (2010).
9. Dweck, M. R. *et al.* Noninvasive Molecular Imaging of Disease Activity in Atherosclerosis. *Circ. Res.* **119**, 330–340 (2016).
10. Robert Cronin Yung Peng, Rose Khavari, N. D. HHS Public Access. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
11. Niland, S. & Eble, J. A. Integrin-mediated cell-matrix interaction in physiological and pathological blood vessel formation. *J. Oncol.* **2012**, (2012).
12. Galley, H. F. & Webster, N. R. Physiology of the endothelium. *Br. J. Anaesth.* **93**, 105–113 (2004).
13. Badimon, L., Padró, T. & Vilahur, G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur. Hear. J. Acute Cardiovasc. Care* **1**, 60–74 (2012).
14. Thyberg, J., Blomgren, K., Roy, J., Tran, P. K. & Hedin, U. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 837–846 (1997).
15. Libby, P. & Hansson, G. K. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: Players and layers. *Circ. Res.* **116**, 307–311 (2015).
16. Heistad, D. D., Marcus, M. L., Larsen, G. E. & Armstrong, M. L. Role of vasa vasorum in nourishment of the aortic wall. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **9**, 781–787 (1981).
17. Galkina, E. *et al.* Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *J. Exp. Med.* **203**, 1273–1282 (2006).
18. Michel, J. B. *et al.* Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc. Res.* **90**, 18–27 (2011).

19. Fésüs, G. *et al.* Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc. Res.* **75**, 719–727 (2007).
20. Stary, H. *et al.* AHA Medical / Scientific Statement Special Report A Definition of Initial , Fatty Streak , and Intermediate Lesions of Atherosclerosis. *Circulation* **89**, 2462–2478 (1994).
21. Stary, H. C. *et al.* A Definition of the Intima of Human Arteries and of Its Atherosclerosis-Prone Regions. *Circulation* **85**, 391–405 (1992).
22. Stary, H. C. *et al.* 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**, 1355–1374 (1995).
23. Stary, H. C. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions an update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1177–1178 (2000).
24. Moore, K. J. & Tabas, I. The Cellular Biology of Macrophages in Atherosclerosis. *Cell* **145**, 341–355 (2011).
25. Yahagi, K. *et al.* Pathology of human coronary and carotid artery atherosclerosis and vascular calcification in diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 191–204 (2017).
26. Stary, H. C. Studies of regression and residual lesion composition in rhesus monkeys. *Atlas Atheroscler. Progress. Regression. Parthenon Publ. Group, New York, London* 32–37 (1999).
27. Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A. & Schwartz, S. M. Lessons From Sudden Coronary Death. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1262–1275 (2000).
28. Nakashima, Y., Fujii, H., Sumiyoshi, S., Wight, T. N. & Sueishi, K. Early human atherosclerosis: Accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1159–1165 (2007).
29. Williams, H. J., Fisher, E. A. & Greaves, D. R. Macrophage differentiation and function in atherosclerosis: Opportunities for therapeutic intervention? *J. Innate Immun.* **4**, 498–508 (2012).
30. Richards *et al.* HHS Public Access. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2018).
31. Otsuka, F. *et al.* Neoatherosclerosis: Overview of histopathologic findings and implications for intravascular imaging assessment. *Eur. Heart J.* **36**, 2147–2159 (2015).
32. Stupka, N. *et al.* Versican processing by a disintegrin-like and metalloproteinase domain with thrombospondin-1 repeats proteinases-5 and-15 facilitates myoblast fusion. *J. Biol. Chem.* **288**, 1907–1917 (2013).
33. Narula, J. *et al.* Arithmetic of vulnerable plaques for noninvasive imaging. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **5**, (2008).
34. Risk, C., Morphologymen, F., Coronary, W., Who, D. & Suddenly, D. The New England Journal of Medicine CORONARY RISK FACTORS AND PLAQUE MORPHOLOGY IN MEN WITH CORONARY DISEASE WHO DIED SUDDENLY. *J. Med.* 3–9 (1997).
35. Davies, M. J. & Thomas, A. C. Plaque fissuring - the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br. Heart J.* **53**, 363–373 (1985).
36. Bondjers, G., Olofsson, S. -O, Fager, A. & Wiklund, O. Atherosclerosis Basic Mechanisms. *Acta Med. Scand.* **220**, 10–18 (1986).
37. Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D. & Farb, A. Vulnerable plaque: The pathology of unstable coronary lesions. *J. Interv. Cardiol.* **15**, 439–446 (2002).

38. Virmani, R. *et al.* Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: Angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2054–2061 (2005).
39. Kolodgie, F. D. *et al.* Intraplaque Hemorrhage and Progression of Coronary Atheroma. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2316–2325 (2003).
40. Libby, P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* **91**, 2844–2850 (1995).
41. Libby, P. & Aikawa, M. New insights into plaque stabilisation by lipid lowering. *Drugs* **56**, 9–13 (1998).
42. Pasterkamp, G., Den Ruijter, H. M. & Libby, P. Temporal shifts in clinical presentation and underlying mechanisms of atherosclerotic disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 21–29 (2016).
43. Andrew, F. *et al.* Coronary Plaque Erosion Without Rupture Into a Lipid Core . *Circulation* **93**, 1354–1363 (1996).
44. Hu, S. *et al.* Residual thrombus pattern in patients with ST-segment elevation myocardial infarction caused by plaque erosion versus plaque rupture after successful fibrinolysis: An optical coherence tomography study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 1336–1338 (2014).
45. Jia, H. *et al.* In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 1748–1758 (2013).
46. Schwartz, R. S. *et al.* Microemboli and Microvascular Obstruction in Acute Coronary Thrombosis and Sudden Coronary Death. Relation to Epicardial Plaque Histopathology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 2167–2173 (2009).
47. Virmani, R. *et al.* Pathology and Pathophysiology of Coronary Atherosclerotic Plaques. *CT Hear.* 351–364 (2005) doi:10.1385/1-59259-818-8:351.
48. Musunuru, K. Atherogenic dyslipidemia: Cardiovascular risk and dietary intervention. *Lipids* **45**, 907–914 (2010).
49. Sarwar, N. *et al.* Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10 158 Incident cases among 262 525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* **115**, 450–458 (2007).
50. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233–241 (2000).
51. Zaroni, P., Velagapudi, S., Yalcinkaya, M., Rohrer, L. & von Eckardstein, A. Endocytosis of lipoproteins. *Atherosclerosis* **275**, 273–295 (2018).
52. Nordestgaard, B. G., Wootton, R. & Lewis, B. Selective retention of VLDL, IDL, and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits in vivo: Molecular size as a determinant of fractional loss from the intima-inner media. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 534–542 (1995).
53. Borén, J. *et al.* Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective Apo-B100. *J. Clin. Invest.* **101**, 1084–1093 (1998).
54. Rahimi, N. Defenders and challengers of endothelial barrier function. *Front. Immunol.* **8**, 1–10 (2017).
55. Lockwood, C. M. Commentary. *Clin. Chem.* **60**, 305–306 (2014).
56. Mehta, D. & Malik, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.*

- 86**, 279–367 (2006).
57. Zhang, X., Sessa, W. C. & Fernández-Hernando, C. Endothelial Transcytosis of Lipoproteins in Atherosclerosis. *Front. Cardiovasc. Med.* **5**, 1–6 (2018).
58. Kraehling, J. R. *et al.* Genome-wide RNAi screen reveals ALK1 mediates LDL uptake and transcytosis in endothelial cells. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
59. Borén, J. & Williams, K. J. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: A triumph of simplicity. *Curr. Opin. Lipidol.* **27**, 473–483 (2016).
60. Oorni, K., Pentikainen, M. O., Ala-Korpela, M. & Kovanen, P. T. Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: Molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J. Lipid Res.* **41**, 1703–1714 (2000).
61. Houde, M. & Van Eck, M. Escaping the atherogenic trap: Preventing LDL fusion and binding in the intima. *Atherosclerosis* **275**, 376–378 (2018).
62. Soto, Y. *et al.* Antiatherosclerotic effect of an antibody that binds to extracellular matrix glycosaminoglycans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 595–604 (2012).
63. Berneis, K. K. & Krauss, R. M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J. Lipid Res.* **43**, 1363–1379 (2002).
64. Rudel. Associations of low density lipoprotein particle composition with atherogenicity. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 19–24 (2004).
65. Ruuth, M. *et al.* Susceptibility of low-density lipoprotein particles to aggregate depends on particle lipidome, is modifiable, and associates with future cardiovascular deaths. *Eur. Heart J.* **39**, 2562–2573 (2018).
66. Borén, J. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: Pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* **41**, 2313–2330 (2020).
67. Tabas, I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: Basic concepts and physiological implications. *J. Clin. Invest.* **110**, 905–911 (2002).
68. Falk, E., Shah, P. K. & Fuster, V. Coronary plaque disruption. *Circulation* **92**, 657–671 (1995).
69. de la Llera Moya, M. *et al.* Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. *Atherosclerosis* **222**, 390–394 (2012).
70. Feng, B. *et al.* The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell Biol.* **5**, 781–792 (2003).
71. Zhao, B. *et al.* Macrophage-specific transgenic expression of cholesteryl ester hydrolase significantly reduces atherosclerosis and lesion necrosis in Ldlr^{-/-} mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 2983–2992 (2007).
72. Abela, G. S. & Aziz, K. Cholesterol crystals rupture biological membranes and human plaques during acute cardiovascular events - A novel insight into plaque rupture by scanning electron microscopy. *Scanning* **28**, 1–10 (2006).
73. Abela, G. S. *et al.* Effect of Cholesterol Crystals on Plaques and Intima in Arteries of Patients With Acute Coronary and Cerebrovascular Syndromes. *Am. J. Cardiol.* **103**, 959–968 (2009).
74. Abela, G. S. Cholesterol crystals piercing the arterial plaque and intima trigger local and systemic

- inflammation. *J. Clin. Lipidol.* **4**, 156–164 (2010).
75. Janoudi, A., Shamoun, F. E., Kalavakunta, J. K. & Abela, G. S. Cholesterol crystal induced arterial inflammation and destabilization of atherosclerotic plaque. *Eur. Heart J.* **37**, 1959–1967 (2016).
76. Duewell, P. *et al.* Activated By Cholesterol Crystals That Form Early in Disease. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
77. Tall, A. R. & Yvan-Charvet, L. Cholesterol Metabolism and Immunity HHS Public Access Author manuscript. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 104–116 (2014).
78. Libby, P. & Plutzky, J. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *Int. Congr. Symp. Ser. - R. Soc. Med.* 27–31 (2000).
79. Tabas, I., García-Cardena, G. & Owens, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J. Cell Biol.* **209**, 13–22 (2015).
80. Chistiakov, D. A., Grechko, A. V., Myasoedova, V. A., Melnichenko, A. A. & Orekhov, A. N. The role of monocytes and neutrophilia in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 1366–1382 (2018).
81. Lindahl, B., Toss, H., Siegbahn, A., Venge, P. & Wallentin, L. Markers of Myocardial Damage and Inflammation in Relation to Long-Term Mortality in Unstable Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1139–1147 (2000).
82. Damås, J. K. *et al.* Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: Possible role of chemokines and platelets. *Circulation* **107**, 2670–2676 (2003).
83. Biasucci, L. M. *et al.* Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* **94**, 874–877 (1996).
84. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1119–1131 (2017).
85. Lesavre, P. & Halbwachs-mecarelli, L. Neutrophils : Molecules , Functions and. **80**, 617–653 (2000).
86. Pende, A., Artom, N., Bertolotto, M., Montecucco, F. & Dallegri, F. Role of neutrophils in atherogenesis: An update. *Eur. J. Clin. Invest.* **46**, 252–263 (2016).
87. -- 4 6 0. **294**, (2001).
88. Drechsler, M., Megens, R. T. A., Van Zandvoort, M., Weber, C. & Soehnlein, O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* **122**, 1837–1845 (2010).
89. Ionita, M. G. *et al.* High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1842–1848 (2010).
90. Rotzius, P. *et al.* Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE ^{-/-} mice. *Am. J. Pathol.* **177**, 493–500 (2010).
91. Döring, Y. *et al.* Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice. *Circ. Res.* **110**, 1052–1056 (2012).
92. Soehnlein, O. *et al.* Neutrophil-Derived Heparin-Binding Protein (HBP/CAP37) Deposited on Endothelium Enhances Monocyte Arrest under Flow Conditions. *J. Immunol.* **174**, 6399–6405 (2005).

93. Malle, E., Marsche, G., Arnhold, J. & Davies, M. J. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 392–415 (2006).
94. Libby, P. Coronary Syndromes. *Circulation* 365–372 (2001).
95. Dorweiler, B. *et al.* Subendothelial infiltration of neutrophil granulocytes and liberation of matrix-destabilizing enzymes in an experimental model of human neo-intima. *Thromb. Haemost.* **99**, 373–381 (2008).
96. Soehnlein, O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ. Res.* **110**, 875–888 (2012).
97. Franck, G. *et al.* Roles of PAD4 and netosis in experimental atherosclerosis and arterial injury implications for superficial erosion. *Circ. Res.* **123**, 33–42 (2018).
98. Stakos, D. A. *et al.* Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **36**, 1405–1414 (2015).
99. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231–241 (2007).
100. Richards *et al.* HHS Public Access. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2018).
101. Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q. & Papayannopoulos, V. Europe PMC Funders Group Neutrophil extracellular traps license macrophages and Th17 cells for cytokine production in atherosclerosis. **349**, 316–320 (2016).
102. Knight, J. S. *et al.* Models of Atherosclerosis. **114**, 947–956 (2014).
103. Prame Kumar, K., Nicholls, A. J. & Wong, C. H. Y. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell Tissue Res.* **371**, 551–565 (2018).
104. Leitinger, N. & Schulman, I. G. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1120–1126 (2013).
105. Bouhrel, M. A. *et al.* PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. *Cell Metab.* **6**, 137–143 (2007).
106. Feig, J. E. & Feig, J. L. Macrophages, dendritic cells, and regression of atherosclerosis. *Front. Physiol.* **3 JUL**, 1–12 (2012).
107. Bäck, M., Yurdagul, A., Tabas, I., Öörni, K. & Kovanen, P. T. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 389–406 (2019).
108. Bensinger, S. J. & Tontonoz, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* **454**, 470–477 (2008).
109. Tall, A. R., Yvan-Charvet, L., Terasaka, N., Pagler, T. & Wang, N. HDL, ABC Transporters, and Cholesterol Efflux: Implications for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell Metab.* **7**, 365–375 (2008).
110. Chawla, A. Control of macrophage activation and function by PPARs. *Circ. Res.* **106**, 1559–1569 (2010).
111. Kadl, A. *et al.* Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ. Res.* **107**, 737–746 (2010).
112. Gleissner, C. A. *et al.* CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163

- in human macrophages. *Circ. Res.* **106**, 203–211 (2010).
113. Talbot, C. P. J., Plat, J., Ritsch, A. & Mensink, R. P. Determinants of cholesterol efflux capacity in humans. *Prog. Lipid Res.* **69**, 21–32 (2018).
114. Van Gils, J. M. *et al.* The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nat. Immunol.* **13**, 136–143 (2012).
115. Loscalzo, D. E. H. R. C. J. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* **23**, 1–7 (2011).
116. Tabas, I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: The importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2255–2264 (2005).
117. Gautier, E. L. *et al.* Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation* **119**, 1795–1804 (2009).
118. Schrijvers, D. M., De Meyer, G. R. Y., Kockx, M. M., Herman, A. G. & Martinet, W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1256–1261 (2005).
119. Otsuka, F. *et al.* Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. *Atherosclerosis* **241**, 772–782 (2015).
120. Yvan-charvet, L. *et al.* NIH Public Access. **328**, 1689–1693 (2011).
121. Karunakaran, D. *et al.* Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis. *Sci. Adv.* **2**, (2016).
122. Bentzon, J. F. & Falk, E. Atherosclerotic lesions in mouse and man: Is it the same disease? *Curr. Opin. Lipidol.* **21**, 434–440 (2010).
123. Kolodgie, F. D., Gold, H. K. & Burke, A. P. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *ACC Curr. J. Rev.* **13**, 10–11 (2004).
124. Tabas, I. & Bornfeldt, K. E. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ. Res.* **118**, 653–667 (2016).
125. Thorp, E. & Tabas, I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1089–1095 (2009).
126. Fadeel, B. & Orrenius, S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J. Intern. Med.* **258**, 479–517 (2005).
127. Martin, S. J. *et al.* Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of BCL-2 and Abl. *J. Exp. Med.* **182**, 1545–1556 (1995).
128. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
129. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 231–241 (2008).
130. Ripk, D., Saint, C. D. R., Hôpital, A. & Rip, K. Stéatohépatite non alcoolique et nécroptose. **3**, 1–3.
131. Humphries, F., Yang, S., Wang, B. & Moynagh, P. N. RIP kinases: Key decision makers in cell death and innate immunity. *Cell Death Differ.* **22**, 225–236 (2015).

132. Hosein Mohimani, Alexey Gurevich, Alla Mikheenko, Neha Garg, Louis-Felix Nothias, Akihiro Ninomiya, Kentaro Takada, Pieter C. Dorrestein³, and P. A. P. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
133. Degtarev, A. *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 112–119 (2005).
134. Lin, J. *et al.* A Role of RIP3-Mediated Macrophage Necrosis in Atherosclerosis Development. *Cell Rep.* **3**, 200–210 (2013).
135. Galluzzi, L. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* **34**, 856–880 (2015).
136. Wang, H. *et al.* Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Mol. Cell* **54**, 133–146 (2014).
137. Kavurma, M. M., Rayner, K. J. & Karunakaran, D. The walking dead: Macrophage inflammation and death in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **28**, 91–98 (2017).
138. Silke, J., Rickard, J. A. & Gerlic, M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nat. Immunol.* **16**, 689–697 (2015).
139. Kang, T. B., Yang, S. H., Toth, B., Kovalenko, A. & Wallach, D. Caspase-8 Blocks Kinase RIPK3-Mediated Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Immunity* **38**, 27–40 (2013).
140. Vince, J. E. *et al.* Inhibitor of Apoptosis Proteins Limit RIP3 Kinase-Dependent Interleukin-1 Activation. *Immunity* **36**, 215–227 (2012).
141. Karunakaran, D. *et al.* Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis. **1**, (2016).
142. Rasheed, A. *et al.* Loss of MLKL (Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein) Decreases Necrotic Core but Increases Macrophage Lipid Accumulation in Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1155–1167 (2020) doi:10.1161/ATVBAHA.119.313640.
143. Grebe, A., Hoss, F. & Latz, E. NLRP3 inflammasome and the IL-1 pathway in atherosclerosis. *Circ. Res.* **122**, 1722–1740 (2018).
144. Kesavardhana, S., Malireddi, R. K. S. & Kanneganti, T. D. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annu. Rev. Immunol.* **38**, 567–595 (2020).
145. Li, Y. *et al.* VX-765 attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice by modulating VSMCs pyroptosis. *Exp. Cell Res.* **389**, 111847 (2020).
146. Harrington, R. A. Targeting Inflammation in Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1197–1198 (2017).
147. Qamar, A. & Rader, D. J. Effect of interleukin 1 β inhibition in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **23**, 548–553 (2012).
148. Gomez, D. *et al.* Interleukin-1 β has atheroprotective effects in advanced atherosclerotic lesions of mice. *Nat. Med.* **24**, 1418–1429 (2018).
149. Rosenson, R. S., Hegele, R. A., Fazio, S. & Cannon, C. P. The Evolving Future of PCSK9 Inhibitors. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 314–329 (2018).
150. Jacobsen, K. *et al.* Diverse cellular architecture of atherosclerotic plaque derives from clonal expansion of a few medial SMCs. *JCI Insight* **19**, (2021).

151. Dobnikar, L. *et al.* Disease-relevant transcriptional signatures identified in individual smooth muscle cells from healthy mouse vessels. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
152. Grootaert, M. O. J. & Bennett, M. R. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment. *Cardiovasc. Res.* 1–14 (2021) doi:10.1093/cvr/cvab046.
153. Feil, S. *et al.* Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circ. Res.* **115**, 662–667 (2014).
154. Liu, M. & Gomez, D. Smooth Muscle Cell Phenotypic Diversity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 1715–1723 (2019).
155. Wirka, R. C. *et al.* Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis. *Nat. Med.* **25**, 1280–1289 (2019).
156. Basatemur, G. L., Jørgensen, H. F., Clarke, M. C. H., Bennett, M. R. & Mallat, Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 727–744 (2019).
157. Pan, H. *et al.* Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State during Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human. *Circulation* 2060–2075 (2020) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048378.
158. Naik, V. *et al.* Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: An in vivo genetic fate mapping study. *Cardiovasc. Res.* **94**, 545–554 (2012).
159. Durham, A. L., Speer, M. Y., Scatena, M., Giachelli, C. M. & Shanahan, C. M. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: Implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc. Res.* **114**, 590–600 (2018).
160. Komori, T., Yagi, * H., Nomura, S. & Yamaguchi, A. Targeted disruption of. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8692–7 (1998).
161. Sun, Y. *et al.* Smooth Muscle Cell – Specific Runx2 Deficiency Inhibits Vascular Calcification The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Data Supplement (unedited) at : (2012).
162. Lin, M. E. *et al.* Runx2 deletion in smooth muscle cells inhibits vascular osteochondrogenesis and calcification but not atherosclerotic lesion formation. *Cardiovasc. Res.* **112**, 606–616 (2016).
163. Allahverdian, S., Chaabane, C., Boukais, K., Francis, G. A. & Bochaton-Piallat, M. L. Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **114**, 540–550 (2018).
164. Johnson, J. L. Metalloproteinases in atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* **816**, 93–106 (2017).
165. Kapustin, A. N. *et al.* Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ. Res.* **116**, 1312–1323 (2015).
166. Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* **75**, 487–517 (1995).
167. Röhl, S. *et al.* Transcriptomic profiling of experimental arterial injury reveals new mechanisms and temporal dynamics in vascular healing response. *JVS Vasc. Sci.* **1**, 13–27 (2020).
168. Allahverdian, S., Chehroudi, A. C., McManus, B. M., Abraham, T. & Francis, G. A. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation* **129**, 1551–1559 (2014).
169. Chappell, J. *et al.* Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial

- Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models. *Circ. Res.* **119**, 1313–1323 (2016).
170. Klouche, M., Rose-john, S., Schmiedt, W. & Bhakdi, S. Transformation , and Proliferation Staining of Foam Cells. 1799–1805 (2000).
171. Kedi, X., Ming, Y., Yongping, W., Yi, Y. & Xiaoxiang, Z. Free cholesterol overloading induced smooth muscle cells death and activated both ER- and mitochondrial-dependent death pathway. *Atherosclerosis* **207**, 123–130 (2009).
172. Shankman, L. S. *et al.* KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat. Med.* **21**, 628–637 (2015).
173. Rong, J. X., Shapiro, M., Trogan, E. & Fisher, E. A. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13531–13536 (2003).
174. Sorokin, V. *et al.* Role of Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Interactions in Vessel Wall Inflammation. *Front. Immunol.* **11**, 1–16 (2020).
175. Baylis, R. A., Gomez, D., Mallat, Z., Pasterkamp, G. & Owens, G. K. The CANTOS trial one important step for clinical cardiology but a giant leap for vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, e174–e177 (2017).
176. Webster, W. S., Bishop, S. P. & Geer, J. C. Experimental aortic intimal thickening. I. Morphology and source of intimal cells. *Am. J. Pathol.* **76**, 245–260 (1974).
177. Bennett, M. R. & Boyle, J. J. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **138**, 3–9 (1998).
178. Clowes, A. W. & Schwartz, S. M. in the Injured Rat Carotid Artery. *Circ. Res.* **56**, 139–145 (1985).
179. Misra, A. *et al.* Integrin beta3 regulates clonality and fate of smooth muscle-derived atherosclerotic plaque cells. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
180. Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **5**, 99–118 (2010).
181. Zhu, Y., Armstrong, J. L., Tchkonina, T. & Kirkland, J. L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype in age-related chronic diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **17**, 324–328 (2014).
182. Matthews, C. *et al.* Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: Effects of telomerase and oxidative stress. *Circ. Res.* **99**, 156–164 (2006).
183. Uryga, A. K. & Bennett, M. R. Ageing induced vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *J. Physiol.* **594**, 2115–2124 (2016).
184. Gardner, S. E., Humphry, M., Bennett, M. R. & Clarke, M. C. H. Senescent vascular smooth muscle cells drive inflammation through an interleukin-1 α -dependent senescence-associated secretory phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1963–1974 (2015).
185. Minamino, T. *et al.* Ras Induces Vascular Smooth Muscle Cell Senescence and Inflammation in Human Atherosclerosis. *Circulation* **108**, 2264–2269 (2003).
186. Dautova, Y. *et al.* Calcium phosphate particles stimulate interleukin-1 β release from human vascular smooth muscle cells: A role for spleen tyrosine kinase and exosome release. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **115**, 82–93 (2018).

187. Grootaert, M. O. J. *et al.* Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **114**, 622–634 (2018).
188. Barallobre-Barreiro, J. *et al.* Extracellular Matrix in Vascular Disease, Part 2/4: JACC Focus Seminar. *J. Am. Coll. Cardiol.* **75**, 2189–2203 (2020).
189. Boon, W., Greenberg, A. S., Kitslaar, P. J. E. H. M., Tordoir, J. H. M. & Daemen, M. J. a P. Human Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 2307–2315 (2016).
190. Bauriedel, G. *et al.* Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: Implications for plaque instability. *Cardiovasc. Res.* **41**, 480–488 (1999).
191. Bennett, M. R., Sinha, S. & Owens, G. K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ. Res.* **118**, (2016).
192. Coornaert, I. *et al.* Novel drug discovery strategies for atherosclerosis that target necrosis and necroptosis. *Expert Opin. Drug Discov.* **13**, 477–488 (2018).
193. Clarke, M. C. H., Talib, S., Figg, N. L. & Bennett, M. R. Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1-directed inflammation: Effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis. *Circ. Res.* **106**, 363–372 (2010).
194. D’Agostino, R. B., Pencina, M. J., Massaro, J. M. & Coady, S. Cardiovascular disease risk assessment: Insights from Framingham. *Glob. Heart* **8**, 11–23 (2013).
195. Demer, L. L. & Tintut, Y. Vascular calcification: Pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* **117**, 2938–2948 (2008).
196. Adelhoefer, S. *et al.* Coronary Artery Calcium Scoring: New Insights into Clinical Interpretation—Lessons from the CAC Consortium. *Radiol. Cardiothorac. Imaging* **2**, e200281 (2020).
197. Goff, D. C. *et al.* 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: A report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines. *Circulation* **129**, (2014).
198. Greenland, P., Blaha, M. J., Budoff, M. J., Erbel, R. & Watson, K. E. Coronary Calcium Score and Cardiovascular Risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 434–447 (2018).
199. Hecht, H. *et al.* Clinical indications for coronary artery calcium scoring in asymptomatic patients: Expert consensus statement from the Society of Cardiovascular Computed Tomography. *J. Cardiovasc. Comput. Tomogr.* **11**, 157–168 (2017).
200. Shaw, L. J., Raggi, P., Schisterman, E., Berman, D. S. & Callister, T. Q. Prognostic value of cardiac risk factors and coronary artery calcium screening for all-cause mortality. *Radiology* **228**, 826–833 (2003).
201. Zeb, I. & Budoff, M. Coronary artery calcium screening: Does it perform better than other cardiovascular risk stratification tools? *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 6606–6620 (2015).
202. Schmermund, A. *et al.* Coronary atherosclerosis in unheralded sudden coronary death under age 50: Histo-pathologic comparison with ‘healthy’ subjects dying out of hospital. *Atherosclerosis* **155**, 499–508 (2001).
203. Wang, Y., Osborne, M. T., Tung, B., Li, M. & Li, Y. Imaging cardiovascular calcification. *J. Am. Heart Assoc.* **7**, 1–16 (2018).
204. Doris, M. K. *et al.* Coronary 18F-Fluoride Uptake and Progression of Coronary Artery Calcification. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 1–11 (2020) doi:10.1161/CIRCIMAGING.120.011438.

205. Mori, H. *et al.* Coronary Artery Calcification and its Progression: What Does it Really Mean? *JACC Cardiovasc. Imaging* **11**, 127–142 (2018).
206. Jones, M. R. *et al.* Intravascular frequency-domain optical coherence tomography assessment of carotid artery disease in symptomatic and asymptomatic patients. *JACC Cardiovasc. Interv.* **7**, 674–684 (2014).
207. Nandalur, K. R., Baskurt, E., Hagspiel, K. D., Phillips, C. D. & Kramer, C. M. Calcified carotid atherosclerotic plaque is associated less with ischemic symptoms than is noncalcified plaque on MDCT. *Am. J. Roentgenol.* **184**, 295–298 (2005).
208. Yamada, S. *et al.* Intramural location and size of arterial calcification are associated with stenosis at carotid bifurcation. *Eur. J. Radiol.* **83**, 957–963 (2014).
209. Espitia, O. *et al.* Implication of molecular vascular smooth muscle cell heterogeneity among arterial beds in arterial calcification. *PLoS One* **13**, 1–17 (2018).
210. Otsuka, F., Joner, M., Prati, F., Virmani, R. & Narula, J. Clinical classification of plaque morphology in coronary disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 379–389 (2014).
211. Burke, A. P. *et al.* Healed Plaque Ruptures and Sudden Coronary Death. *Circulation* **103**, 934–940 (2001).
212. Sangiorgi, G. *et al.* Arterial calcification and not lumen stenosis is highly correlated with atherosclerotic plaque burden in humans: A histologic study of 723 coronary artery segments using nondecalcifying methodology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **31**, 126–133 (1998).
213. Jinnouchi, H. *et al.* Calcium deposition within coronary atherosclerotic lesion: Implications for plaque stability. *Atherosclerosis* **306**, 85–95 (2020).
214. Sato, Y., Finn, A. V. & Virmani, R. Calcified nodule: A rare but important cause of acute coronary syndrome with worse clinical outcomes. *Atherosclerosis* **318**, 40–42 (2021).
215. Herisson, F. *et al.* Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis* **216**, 348–354 (2011).
216. Yahagi, K. *et al.* Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **13**, 79–98 (2016).
217. Mauriello, A. *et al.* Coronary calcification identifies the vulnerable patient rather than the vulnerable Plaque. *Atherosclerosis* **229**, 124–129 (2013).
218. Torii, S. *et al.* Histopathologic Characterization of Peripheral Arteries in Subjects With Abundant Risk Factors: Correlating Imaging With Pathology. *JACC Cardiovasc. Imaging* **12**, 1501–1513 (2019).
219. Xu, X. *et al.* High-resolution MR study of the relationship between superficial calcification and the stability of carotid atherosclerotic plaque. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **26**, 143–150 (2010).
220. Yang, J. *et al.* Superficial and multiple calcifications and ulceration associate with intraplaque hemorrhage in the carotid atherosclerotic plaque. *Eur. Radiol.* **28**, 4968–4977 (2018).
221. Teng, Z. *et al.* How does juxtaluminal calcium affect critical mechanical conditions in carotid atherosclerotic plaque? An exploratory study. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **61**, 35–40 (2014).
222. Li, Z. Y. *et al.* Does calcium deposition play a role in the stability of atheroma? Location may be the key. *Cerebrovasc. Dis.* **24**, 452–459 (2007).
223. Huang, H. *et al.* The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic

- plaques. *Circulation* **103**, 1051–1056 (2001).
224. Gössl, M. *et al.* Segmental Heterogeneity of Vasa Vasorum Neovascularization in Human Coronary Atherosclerosis. *JACC Cardiovasc. Imaging* **3**, 32–40 (2010).
225. Hutcheson, J. D. *et al.* Genesis and growth of extracellular-vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques. *Nat. Mater.* **15**, 335–343 (2016).
226. Pawade, T. A., Newby, D. E. & Dweck, M. R. Calcification in aortic stenosis: The skeleton key. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66**, 561–577 (2015).
227. Barrett, H. E., Van der Heiden, K., Farrell, E., Gijssen, F. J. H. & Akyildiz, A. C. Calcifications in atherosclerotic plaques and impact on plaque biomechanics. *Journal of Biomechanics* vol. 87 (2019).
228. Irkle, A. *et al.* Identifying active vascular microcalcification by 18F-sodium fluoride positron emission tomography. *Nat. Commun.* **6**, 1–11 (2015).
229. Mizukoshi, M. *et al.* Coronary superficial and spotty calcium deposits in culprit coronary lesions of acute coronary syndrome as determined by optical coherence tomography. *Am. J. Cardiol.* **112**, 34–40 (2013).
230. Ong, D. S. *et al.* Coronary calcification and plaque vulnerability: An optical coherence tomographic study. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **9**, (2016).
231. Abedin, M., Tintut, Y. & Demer, L. L. Vascular calcification: Mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1161–1170 (2004).
232. Shioi, A. & Ikari, Y. Plaque calcification during atherosclerosis progression and regression. *J. Atheroscler. Thromb.* **25**, 294–303 (2018).
233. Pugliese, G., Iacobini, C., Fantauzzi, C. B. & Menini, S. The dark and bright side of atherosclerotic calcification. *Atherosclerosis* **238**, 220–230 (2015).
234. Lech, M. & Anders, H. J. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1832**, 989–997 (2013).
235. Duffield, J. S., Lupher, M., Thannickal, V. J. & Wynn, T. A. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **8**, 241–276 (2013).
236. Kelly-Arnold, A. *et al.* Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 10741–10746 (2013).
237. Vengrenyuk, Y. *et al.* A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 14678–14683 (2006).
238. Maldonado, N. *et al.* A mechanistic analysis of the role of microcalcifications in atherosclerotic plaque stability: Potential implications for plaque rupture. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **303**, 619–629 (2012).
239. New, S. E. P. *et al.* Macrophage-derived matrix vesicles : An alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ. Res.* **113**, 72–77 (2013).
240. Bucerius, J., Dijkgraaf, I., Mottaghy, F. M. & Schurgers, L. J. Target identification for the diagnosis and intervention of vulnerable atherosclerotic plaques beyond 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging: promising tracers on the horizon. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **46**, 251–265 (2019).

241. Abdelbaky, A. *et al.* Focal arterial inflammation precedes subsequent calcification in the same location: A longitudinal FDG-PET/CT study. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **6**, 747–754 (2013).
242. Aikawa, E. *et al.* Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* **116**, 2841–2850 (2007).
243. Chatrou, M. L. L. *et al.* Intra-section analysis of human coronary arteries reveals a potential role for micro-calcifications in macrophage recruitment in the early stage of atherosclerosis. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
244. Nadra, I. *et al.* Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: A vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ. Res.* **96**, 1248–1256 (2005).
245. Mountziaris, P. M., Spicer, P. P., Kasper, F. K. & Mikos, A. G. Harnessing and modulating inflammation in strategies for bone regeneration. *Tissue Eng. - Part B Rev.* **17**, 393–402 (2011).
246. Cardoso, L., Kelly-Arnold, A., Maldonado, N., Laudier, D. & Weinbaum, S. Effect of tissue properties, shape and orientation of microcalcifications on vulnerable cap stability using different hyperelastic constitutive models. *J. Biomech.* **47**, 870–877 (2014).
247. Rambhia, S. H. *et al.* Microcalcifications increase coronary vulnerable plaque rupture potential: A patient-based micro-ct fluid-structure interaction study. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 1443–1454 (2012).
248. Bobryshev, Y. V., Ivanova, E. A., Chistiakov, D. A., Nikiforov, N. G. & Orekhov, A. N. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *Biomed Res. Int.* **2016**, (2016).
249. Ikeda, K. *et al.* 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**, 39–44 (2012).
250. Bessueille, L. & Magne, D. Inflammation: A culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 2475–2489 (2015).
251. Li, X., Yang, H. Y. & Giachelli, C. M. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **199**, 271–277 (2008).
252. Luo, G. *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* vol. 386 78–81 (1997).
253. Boström, K. *et al.* Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* **91**, 1800–1809 (1993).
254. Proudfoot, D. *et al.* Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: Evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ. Res.* **87**, 1055–1062 (2000).
255. Meng, L., Jin, W. & Wang, X. RIP3-mediated necrotic cell death accelerates systematic inflammation and mortality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 11007–11012 (2015).
256. Azoidis, I., Cox, S. C. & Davies, O. G. The role of extracellular vesicles in biomineralisation: current perspective and application in regenerative medicine. *J. Tissue Eng.* **9**, (2018).
257. Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G. & Théry, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **21**, 9–17 (2019).
258. Aikawa, E. & Blaser, M. C. 2020 Jeffrey M. Hoeg Award Lecture: Calcifying Extracellular Vesicles

- as Building Blocks of Microcalcifications in Cardiovascular Disorders. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **117**–127 (2020) doi:10.1161/ATVBAHA.120.314704.
259. Anderson, H. C. Matrix vesicles and calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* **5**, 222–226 (2003).
260. Bottini, M. *et al.* Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1862**, 532–546 (2018).
261. Bobryshev, Y. V., Killingsworth, M. C., Lord, R. S. A. & Grabs, A. J. Matrix vesicles in the fibrous cap of atherosclerotic plaque: Possible contribution to plaque rupture. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 2073–2082 (2008).
262. Aikawa, E. & Blaser, M. C. 2020 Jeffrey M. Hoeg Award Lecture; Calcifying Extracellular Vesicles as Building Blocks of Microcalcifications in Cardiovascular Disorders. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **41**, 117–127 (2021).
263. Purroy, A. *et al.* Matrix metalloproteinase-10 deficiency delays atherosclerosis progression and plaque calcification. *Atherosclerosis* **278**, 124–134 (2018).
264. Qiao, J. H., Fishbein, M. C., Demer, L. L. & Lusis, A. J. Genetic determination of cartilaginous metaplasia in mouse aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 2265–2272 (1995).
265. Rattazzi, M. *et al.* Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: Potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1420–1425 (2005).
266. Derwall, M. *et al.* Inhibition of bone morphogenetic protein signaling reduces vascular calcification and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 613–622 (2012).
267. Yao, Y. *et al.* Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ. Res.* **107**, 485–494 (2010).
268. Malhotra, R. *et al.* Inhibition of bone morphogenetic protein signal transduction prevents the medial vascular calcification associated with matrix gla protein deficiency. *PLoS One* **10**, 1–21 (2015).
269. Giachelli, C. M. *et al.* Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **92**, 1686–1696 (1993).
270. Aigner, T., Neureiter, D., Câmpean, V., Soder, S. & Amann, K. Expression of cartilage-specific markers in calcified and non-calcified atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* **196**, 37–41 (2008).
271. Kuzan, A. *et al.* The content of collagen type II in human arteries is correlated with the stage of atherosclerosis and calcification foci. *Cardiovasc. Pathol.* **28**, 21–27 (2017).
272. Tyson, K. L. *et al.* Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 489–494 (2003).
273. Hunt, J. L. *et al.* Bone formation in carotid plaques: A Clinicopathological study. *Stroke* **33**, 1214–1219 (2002).
274. Mohler, E. R. *et al.* Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* **103**, 1522–1528 (2001).
275. Roijers, R. B. *et al.* Microcalcifications in early intimal lesions of atherosclerotic human coronary arteries. *Am. J. Pathol.* **178**, 2879–2887 (2011).

276. Carr, J. J. *et al.* Association of coronary artery calcium in adults aged 32 to 46 years with incident coronary heart disease and death. *JAMA Cardiol.* **2**, 391–399 (2017).
277. Harris, H. The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* **186**, 133–150 (1990).
278. Mornet, E. *et al.* Structural Evidence for a Functional Role of Human Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase in Bone Mineralization. *J. Biol. Chem.* **276**, 31171–31178 (2001).
279. Halling Linder, C., Narisawa, S., Millán, J. L. & Magnusson, P. Glycosylation differences contribute to distinct catalytic properties among bone alkaline phosphatase isoforms. *Bone* **45**, 987–993 (2009).
280. Jemmerson, R. & Low, M. G. Phosphatidylinositol Anchor of HeLa Cell Alkaline Phosphatase. *Biochemistry* **26**, 5703–5709 (1987).
281. Millán, J. L. Alkaline phosphatases. *Purinergic Signal.* **2**, 335–341 (2006).
282. Le Du, M. H. & Millán, J. L. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* **277**, 49808–49814 (2002).
283. Percudani, R. & Peracchi, A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep.* **4**, 850–854 (2003).
284. Smith, G. P. & Peters, T. J. Elsevier / North-Holland Biomedical Press BBA 69382 SUBCELLULAR LOCALIZATION AND PROPERTIES OF PYRIDOXAL PHOSPHATE PHOSPHATASES OF HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES AND THEIR RELATIONSHIP TO ACID AND ALKALINE PHOSPHATASE (Received May 11th , 1981) *Usin.* **661**, 287–294 (1981).
285. Wilson, P. D., Smith, G. P. & Peters, T. J. Pyridoxal 5'-phosphate: a possible physiological substrate for alkaline phosphatase in human neutrophils. *Histochem. J.* **15**, 257–264 (1983).
286. Carter, T. C. *et al.* Common variants at putative regulatory sites of the tissue nonspecific alkaline phosphatase gene influence circulating pyridoxal 5'-phosphate concentration in healthy adults. *J. Nutr.* **145**, 1386–1393 (2015).
287. Goettsch, C. *et al.* TNAP as a therapeutic target for cardiovascular calcification: a discussion of its pleiotropic functions in the body. *Cardiovasc. Res.* 1–13 (2020) doi:10.1093/cvr/cvaa299.
288. Hoshi, K., Amizuka, N., Oda, K., Ikehara, Y. & Ozawa, H. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem. Cell Biol.* **107**, 183–191 (1997).
289. Magne, D. *et al.* Cartilage formation in growth plate and arteries: From physiology to pathology. *BioEssays* **27**, 708–716 (2005).
290. Fakhry, M. *et al.* TNAP stimulates vascular smooth muscle cell trans-differentiation into chondrocytes through calcium deposition and BMP-2 activation: Possible implication in atherosclerotic plaque stability. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* vol. 1863 (Elsevier B.V., 2017).
291. Liu, J. *et al.* Tissue-nonspecific alkaline phosphatase deficiency causes abnormal craniofacial bone development in the *Alpl*^{-/-} mouse model of infantile hypophosphatasia. *Bone* **67**, 81–94 (2014).
292. Lee, N. K. *et al.* Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell* **130**, 456–469 (2007).
293. Boens, S., Szekér, K., Eynde, A. Van & Bollen, M. Phosphatase Modulators. *Methods Mol. Biol.* **1053**, 271–281 (2013).

294. 1-s2.0-S1047847783710038-main.pdf.
295. Payne, R. B. & Walker, B. E. Serum-Calcium. *Lancet* **313**, 1248 (1979).
296. Huesa, C. *et al.* PHOSPHO1 is essential for mechanically competent mineralization and the avoidance of spontaneous fractures. *Bone* **48**, 1066–1074 (2011).
297. Murshed, M., Harmey, D., Millán, J. L., McKee, M. D. & Karsenty, G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev.* **19**, 1093–1104 (2005).
298. Anderson, H. C. Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J. Cell Biol.* **35**, 81–101 (1967).
299. Bonucci, E. Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastructure Res.* **20**, 33–50 (1967).
300. Anderson, H. C., Garimella, R. & Tague, S. E. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front. Biosci.* **10**, 822–837 (2005).
301. Cui, L., Houston, D. A., Farquharson, C. & MacRae, V. E. Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. *Bone* **87**, 147–158 (2016).
302. No Title (表示不可能) .
303. Hesse, L. *et al.* Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9445–9449 (2002).
304. Mornet, E., Hofmann, C., Bloch-Zupan, A., Girschick, H. & Le Merrer, M. Clinical utility gene card for: Hypophosphatasia-update 2013. *Eur. J. Hum. Genet.* **22**, 1–6 (2014).
305. Millán, J. L. & Whyte, M. P. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. *Calcif. Tissue Int.* **98**, 398–416 (2016).
306. Bober, M. B. *et al.* Enzyme-Replacement Therapy in Life-Threatening Hypophosphatasia. (2012).
307. Narisawa, S., Fröhlander, N. & Millán, J. L. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev. Dyn.* **208**, 432–446 (1997).
308. Fedde, K. N. *et al.* Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 2015–2026 (1999).
309. Hasegawa, T. *et al.* Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **53**, 34–45 (2017).
310. Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S. & Haskó, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.* **19**, 355–367 (2013).
311. Whyte, P., Armamento-villareal, R., Schranck, W. & Miner, F. L. J. B. X-Linked. **81**, (1996).
312. Iluz-Freundlich, D., Zhang, M., Uhanova, J. & Minuk, G. Y. The relative expression of hepatocellular and cholestatic liver enzymes in adult patients with liver disease. *Ann. Hepatol.* **19**, 204–208 (2020).
313. Graser, S., Liedtke, D. & Jakob, F. Tnap as a new player in chronic inflammatory conditions and metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–14 (2021).
314. Jacobson, K. A., IJerman, A. P. & Müller, C. E. Medicinal chemistry of P2 and adenosine

- receptors: Common scaffolds adapted for multiple targets. *Biochem. Pharmacol.* **187**, 114311 (2021).
315. Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F. & Varani, K. Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. *Physiol. Rev.* **98**, 1591–1625 (2018).
316. Pettengill, M. *et al.* Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *J. Biol. Chem.* **288**, 27315–27326 (2013).
317. Rambaldi, A. *et al.* Expression of leukocyte alkaline phosphatase gene in normal and leukemic cells: Regulation of the transcript by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **76**, 2565–2571 (1990).
318. Bessueille, L. *et al.* Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is an anti-inflammatory nucleotidase. *Bone* **133**, 115262 (2020).
319. Chen, Y. *et al.* ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science (80-.)*. **314**, 1792–1795 (2006).
320. Winter *et al.* © 1962 Nature Publishing Group. *Nat. Int. J. Sci.* **196**, 1048–1050 (1962).
321. Chèvre, R., González-granado, J. M., Megens, R. T. & Sreeramkumar, V. High-Resolution Imaging of Intravascular Atherogenic Inflammation in Live Mice Vicente Andrés The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Data Supplement (unedited) at : (2013) doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.30259.
322. Pettengill, M. *et al.* Human alkaline phosphatase dephosphorylates microbial products and is elevated in preterm neonates with a history of late-onset sepsis. *PLoS One* **12**, 1–12 (2017).
323. Schromm, A. B. *et al.* The charge of endotoxin molecules influences their conformation and IL-6-inducing capacity. *J. Immunol.* **161**, 5464–71 (1998).
324. Lei, W., Ni, H., Herington, J., Reese, J. & Paria, B. C. Alkaline phosphatase protects lipopolysaccharide-induced early pregnancy defects in mice. *PLoS One* **10**, 1–20 (2015).
325. Buchet, R. *et al.* Hydrolysis of extracellular atp by vascular smooth muscle cells transdifferentiated into chondrocytes generates PI but not PPI. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–16 (2021).
326. Halling Linder, C., Englund, U. H., Narisawa, S., Millán, J. L. & Magnusson, P. Isozyme profile and tissue-origin of alkaline phosphatases in mouse serum. *Bone* **53**, 399–408 (2013).
327. Suzuki, N. *et al.* Altered expression of alkaline phosphatase (ALP) in the liver of primary biliary cirrhosis (PBC) patients. *Hepatol. Res.* **35**, 37–44 (2006).
328. Alvaro, D. *et al.* The function of alkaline phosphatase in the liver: Regulation of intrahepatic biliary epithelium secretory activities in the rat. *Hepatology* **32**, 174–184 (2000).
329. Villa-Bellosta, R. New insights into endogenous mechanisms of protection against arterial calcification. *Atherosclerosis* **306**, 68–74 (2020).
330. Opdebeeck, B., D'Haese, P. C. & Verhulst, A. Inhibition of tissue non-specific alkaline phosphatase; a novel therapy against arterial media calcification? *J. Pathol.* **250**, 248–250 (2020).
331. O'Neill, W. C. & Lomashvili, K. A. Recent progress in the treatment of vascular calcification. *Kidney Int.* **78**, 1232–1239 (2010).
332. Krueger, T., Westenfeld, R., Ketteler, M., Schurgers, L. J. & Floege, J. Vitamin K deficiency in CKD

- patients: A modifiable risk factor for vascular calcification? *Kidney Int.* **76**, 18–22 (2009).
333. Brylka, L. & Jahnen-Dechent, W. The role of fetuin-A in physiological and pathological mineralization. *Calcif. Tissue Int.* **93**, 355–364 (2013).
334. Reynolds, J. L. *et al.* Multifunctional roles for serum protein fetuin-A in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2920–2930 (2005).
335. Paloian, N. J. & Giachelli, C. M. A current understanding of vascular calcification in CKD. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **307**, F891–F900 (2014).
336. Speer, M. Y. *et al.* 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**, 1047–1055 (2002).
337. Villa-Bellosta, R., Hamczyk, M. R. & Andrés, V. Novel phosphate-activated macrophages prevent ectopic calcification by increasing extracellular ATP and pyrophosphate. *PLoS One* **12**, 1–16 (2017).
338. Villa-Bellosta, R., Millan, A. & Sorribas, V. Role of calcium-phosphate deposition in vascular smooth muscle cell calcification. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **300**, 210–221 (2011).
339. Schoppet, M. & Shanahan, C. M. Role for alkaline phosphatase as an inducer of vascular calcification in renal failure? *Kidney Int.* **73**, 989–991 (2008).
340. Shanahan, C. M. *et al.* Medial Localization of Mineralization-Regulating Proteins in Association With Mönckeberg's Sclerosis. *Circulation* **100**, 2168–2176 (1999).
341. Moe, S. M. *et al.* Assessment of vascular calcification in ESRD patients using spiral CT. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 1152–1158 (2003).
342. Shroff, R. C. *et al.* Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation* **118**, 1748–1757 (2008).
343. St. Hilaire, C. *et al.* NT5E Mutations and Arterial Calcifications. *N. Engl. J. Med.* **364**, 432–442 (2011).
344. Lomashvili, K. A., Garg, P., Narisawa, S., Millan, J. L. & O'Neill, W. C. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: Potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int.* **73**, 1024–1030 (2008).
345. Leroux-Berger, M. *et al.* Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 1543–1553 (2011).
346. Savinov, A. Y. *et al.* Transgenic overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in vascular endothelium results in generalized arterial calcification. *J. Am. Heart Assoc.* **4**, 1–14 (2015).
347. Romanelli, F. *et al.* Overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in endothelial cells accelerates coronary artery disease in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *PLoS One* **12**, 1–24 (2017).
348. Ndrepepa, G. Alkaline phosphatase and cardiovascular disease. *J. Lab. Precis. Med.* **2**, 83–83 (2017).
349. Getz, G. S. & Reardon, C. A. Animal Models of Atherosclerosis. *Anim. Model. Study Hum. Dis. Second Ed.* **32**, 205–217 (2017).
350. Meir, K. S. & Leitersdorf, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse: A decade

- of progress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1006–1014 (2004).
351. Domínguez, V., Govezensky, T., Gevorkian, G. & Larralde, C. Low platelet counts alone do not cause bleeding in an experimental model of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Haematologica* **88**, 679–687 (2003).
352. Mahley, R. W. Apolipoprotein E : Cholesterol Transport. *Science (80-.)*. **240**, 622–630 (1988).
353. Sehayek, E. *et al.* Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: Studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3433–3437 (2000).
354. Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagaman, J. R., Oliver, P. M. & Maeda, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4471–4475 (1992).
355. Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L. & Ross, R. the Arterial Tree. 133–141 (1994).
356. Jawień, J., Nastalek, P. & Korbut, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J. Physiol. Pharmacol.* **55**, 503–517 (2004).
357. Getz, G. S. & Reardon, C. A. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J. Lipid Res.* **50**, 156–161 (2009).
358. Plump, A. S. & Lum, P. Y. Genomics and Cardiovascular Drug Development. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 1089–1100 (2009).
359. Pinkerton, A. B. *et al.* Discovery of 5-((5-chloro-2-methoxyphenyl)sulfonamido)nicotinamide (SBI-425), a potent and orally bioavailable tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) inhibitor. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **28**, 31–34 (2018).
360. Vesey, A. T. *et al.* 18F-Fluoride and 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography after Transient Ischemic Attack or Minor Ischemic Stroke: Case-Control Study. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **10**, 1–10 (2017).
361. MacAskill, M. G. *et al.* Characterisation of an atherosclerotic micro-calcification model using ApoE^{-/-} mice and PET/CT. *IJC Hear. Vasc.* **31**, 10–12 (2020).
362. Hsu, J. J. *et al.* Changes in microarchitecture of atherosclerotic calcification assessed by 18F-NaF PET and CT after a progressive exercise regimen in hyperlipidemic mice. *J. Nucl. Cardiol.* (2020) doi:10.1007/s12350-019-02004-3.
363. Mackenzie, N. C. W. *et al.* MOVAS-1 cell line: A new in vitro model of vascular calcification. *Int. J. Mol. Med.* **27**, 663–668 (2011).
364. Idelevich, A., Rais, Y. & Monsonego-Ornan, E. Bone Gla protein increases HIF-1 α -dependent glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, (2011).
365. Lencel, P. *et al.* Cell-specific effects of TNF- α and IL-1B on alkaline phosphatase: Implication for syndesmophyte formation and vascular calcification. *Lab. Investig.* **91**, 1434–1442 (2011).
366. Canet-Soulas, E., Bessueille, L., Mechtouff, L. & Magne, D. The Elusive Origin of Atherosclerotic Plaque Calcification. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 1–11 (2021).
367. Clarke, M. C. H. *et al.* Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat. Med.* **12**, 1075–1080 (2006).

368. Clarke, M. C. H. *et al.* Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ. Res.* **102**, 1529–1538 (2008).
369. Tonelli, M. *et al.* Relation between alkaline phosphatase, serum phosphate, and all-cause or cardiovascular mortality. *Circulation* **120**, 1784–1792 (2009).
370. Krishnamurthy, V. R. *et al.* Associations of serum alkaline phosphatase with metabolic syndrome and mortality. *Am. J. Med.* **124**, 566.e1-566.e7 (2011).
371. Wannamethee, S. G., Sattar, N., Papcosta, O., Lennon, L. & Whincup, P. H. Alkaline phosphatase, serum phosphate, and incident cardiovascular disease and total mortality in older men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1070–1076 (2013).
372. Panh, L. *et al.* Association between serum alkaline phosphatase and coronary artery calcification in a sample of primary cardiovascular prevention patients. *Atherosclerosis* **260**, 81–86 (2017).
373. Rosenfeld, M. E. *et al.* Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the apoE knockout mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2587–2592 (2000).
374. Ehara, S. *et al.* Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: An intravascular ultrasound study. *Circulation* **110**, 3424–3429 (2004).
375. Joshi, N. V. *et al.* 18F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: A prospective clinical trial. *Lancet* **383**, 705–713 (2014).
376. Nakahara, T. *et al.* Coronary Artery Calcification: From Mechanism to Molecular Imaging. *JACC: Cardiovascular Imaging* vol. 10 (2017).
377. Tintut, Y., Patel, J., Parhami, F. & Demer, L. L. Tumor necrosis factor- α promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* **102**, 2636–2642 (2000).
378. Shioi, A. *et al.* Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: Roles of tumor necrosis factor- α and oncostatin M derived from macrophages. *Circ. Res.* **91**, 9–16 (2002).
379. Lee, H. L., Woo, K. M., Ryoo, H. M. & Baek, J. H. Tumor necrosis factor- α increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1087–1092 (2010).
380. Lammers, W. J. *et al.* Levels of alkaline phosphatase and bilirubin are surrogate end points of outcomes of patients with primary biliary cirrhosis: An international follow-up study. *Gastroenterology* **147**, 1338-1349.e5 (2014).
381. Gámez-Belmonte, R. *et al.* Deficiency in tissue non-specific alkaline phosphatase leads to steatohepatitis in mice fed a high fat diet similar to that produced by a methionine and choline deficient diet. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–14 (2021).
382. Schippers, M. *et al.* Phosphate Groups in the Lipid A Moiety Determine the Effects of LPS on Hepatic Stellate Cells: A Role for LPS-Dephosphorylating Activity in Liver Fibrosis. *Cells* **9**, 1–15 (2020).
383. Sheen, C. R. *et al.* Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification. *J. Bone Miner. Res.* **30**, 824–836 (2015).
384. Levine, A., Sundberg, J. P. & Uitto, J. of PXE but not in the Enpp1 Mutant Mouse Models of GACI.

- 139**, 360–368 (2020).
385. Tani, T. *et al.* Inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase protects against medial arterial calcification and improves survival probability in the CKD-MBD mouse model. *J. Pathol.* **250**, 30–41 (2020).
386. Opdebeeck, B. *et al.* Chronic kidney disease-induced arterial media calcification in rats prevented by tissue non-specific alkaline phosphatase substrate supplementation rather than inhibition of the enzyme. *Pharmaceutics* **13**, (2021).

Inflammation and microcalcification: a never-ending vicious cycle in atherosclerosis?

Lynn Kawtharany¹, Laurence Bessueille¹, Hawraa Issa², Eva Hamade³, Kazem Zibara³, David Magne¹

¹ ICBMS UMR CNRS 5246, Université Claude Bernard Lyon 1, France.

² College of Public Health, Phoenicia University, District of Zahrani, Lebanon

³ PRASE and Biology Department, Faculty of Sciences - I, Lebanese University, Beirut, Lebanon.

Corresponding author: David Magne

Metabolism, Enzymes and Molecular Mechanisms, ICBMS UMR CNRS 5246 University Lyon 1;

Batiment Raulin 1^{er} étage, 43 bd du 11 novembre 1918 ; 69622 Villeurbanne cedex, France

Abstract

Inflammatory cells and cytokines are known for long to worsen the development of atherosclerotic plaques in mice and intense efforts are today devoted to develop anti-inflammatory therapeutic strategies to slow down plaque development. Increasing data indicate that plaque inflammation is intimately associated with microcalcifications, which exert harmful effects eventually culminating with plaque rupture. In this review article, we will first introduce microcalcification location, detection and effects in atherosclerotic plaques. Then we will present the numerous data suggesting that inflammatory cells and molecules are responsible for the formation of microcalcifications, and the articles showing that microcalcifications stimulate macrophages and smooth muscle cells to produce more pro-inflammatory cytokines. Finally, we will discuss the possibility that microcalcifications might stimulate smooth muscle cells to produce larger and more stable calcifications to stabilize plaques, to exit the vicious cycle associating inflammation and microcalcification in atherosclerotic plaques.

Keywords: atherosclerosis, inflammation, calcification, ossification, cartilage

1- Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease

Atherosclerosis is now recognized as a chronic inflammatory condition, not simply as a lipid storage disease, where cells from both innate and adaptive immunity are involved in its pathogenesis [1]. Instead, Inflammation is involved in the majority of atherosclerosis stages, starting from the initial recruitment of circulating inflammatory cells, the formation and progression of plaques, to the eventual rupture of the latter, leading to thrombotic-related complications [2]. The initial stage of atherosclerosis is primarily mediated by the activation, dysfunction, and structural changes of endothelial cells. This activation can be potentially triggered by routine habits, such as smoking and high saturated-fat diet, as well as the presence of comorbidities such as hypertension, obesity, hyperglycemia, and insulin resistance. The initial phase of atherosclerosis is mediated by the subendothelial accumulation of lipid molecules, including low-density lipoprotein (LDL), which will undergo oxidation by free radicals such as reactive oxygen species (ROS) and oxidative enzymes like lipoxygenases. This would eventually stimulate the expression of various chemokines, for example C-C motif ligand 2 (CCL2) and different adhesion molecules, including E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). The expression of these adhesion molecules, VCAM-1 in particular, leads to the adhesion of innate (monocytes, macrophages, and neutrophils) and adaptive (T-lymphocytes) immune cells as well as activated thrombocytes to the endothelium. While interacting with other leukocytes, activated thrombocytes secrete more cytokines in order to further establish immune cell infiltration. For example, monocytes penetrate the tunica intima of the vascular wall through diapedesis, where they differentiate into macrophages or dendritic cells.

In the same context, macrophages will engulf the modified lipoprotein molecules, leading to the accumulation of cholesterol esters, thus becoming foam cells.

On the other hand, vascular smooth muscle cells (VSMCs) have been shown to give rise to plaque macrophages and foam cells. Rong et al (2003) provided the first demonstration of the acquisition by mouse aortic VSMCs of macrophage-like features after they were cholesterol loaded *in vitro* [3]. The authors demonstrated that these cholesterol-loaded VSMC foam cells not only had downregulation of contractile markers (ACTA2 and MYH11), but also possessed upregulation of key macrophage and phagocytosis marker genes (CD68 and Lgals3). Later on, *ex vivo* approaches using co-staining for cell specific markers revealed the phenotype conversion of VSMCs of the human coronary artery to a macrophage-like state during human atherogenesis [4]. By quantifying VSMC foam cells in human coronary lesions the authors showed that they contribute to up to 50% of total foam cells. Additional *in vivo* studies using the combination of single cell RNA sequencing and VSMC lineage tracing also showed that VSMCs can trans-differentiate, express proinflammatory cytokines and perform phagocytosis [5, 6], and that the contribution of VSMCs within atherosclerotic plaques has been greatly underestimated since they contribute up to 80 % of total foam cells in advanced atherosclerosis [7]. Overall, these data demonstrate the involvement of VSMCs in the lipid uptake and formation of foam cells. It is worth noting in addition to VSMCs, intimal pericytes are also involved in lipid accumulation and the formation of foam cells (reviewed in [8]).

Macrophages multiply, releasing various growth factors, cytokines, and chemokines that occasionally mediate monocytic/T-cellular infiltration in addition to amplifying pro-inflammatory signals. Several pro-inflammatory cytokines, including interferon-gamma (IFN- γ), Interleukins (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, IL-15 and IL-18), tumor necrosis factor (TNF), as well as various anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and family members of transforming growth factor-beta (TGF- β), bone morphogenic proteins (BMPs), and growth differentiation factors (GDFs), have been reported to be released by activated macrophages in atherosclerotic plaques [9]. Moreover, the progressive accumulation of cholesterol in macrophages leads to endoplasmic reticulum (ER) stress and apoptosis [10], while the compromised clearance of apoptotic debris triggers cell necrosis that will further amplify plaque inflammation [11].

Finally, inflammation is directly associated with the formation of a thinner fibrous cap through impeding the integrity of the interstitial collagen matrix, by inhibiting VSMCs to form new collagen fibers, or by promoting the destruction of already existing collagen fibers [12-14].

2- Microcalcifications, but not large calcifications, are harmful

2.1 Different types of calcifications in human plaques

Vascular calcification can develop in several locations and conditions. Calcification associated with atherosclerosis is in general restricted to the intima, but patients with atherosclerosis and type 2 diabetes and/or chronic kidney disease also develop intense medial calcification (reviewed in [15]). If both intimal calcification associated with atherosclerosis and medial calcification associated with diabetes or kidney disease can occur in the same individuals, they occur in distinct tissues and probably have different origin and impact. Therefore, in order to try deliver an understanding message, we will focus this review on intimal plaque calcification. Calcification is a hallmark of atherosclerosis [16] and is believed to profoundly affect plaque stability, mainly because the coronary artery calcium (CAC) score predicts cardiovascular mortality [17]. However, the CAC score commonly measures the calcium content in a patient [18], but it does not give information on the size or type of calcifications that may cause plaque rupture. In fact, calcifications in human plaques are far from being uniform, rather each type of calcification is likely to exert a specific impact on plaque stability [19-21]. The earliest calcifications, also called microcalcifications, are characterized by a size less than 50 μm , mainly originating from the lipid pool and early necrotic core, but can also be formed in the fibrous cap [22, 20, 21]. The mechanisms presumably involved in their formation will be presented in chapter 3. Generally, these microcalcifications progress to form larger calcifications, such as sheets of calcification where both collagen and necrotic core are calcified. Sheet calcifications may in turn fracture into

nodular calcifications [20]. Finally, plaque ossification is predominantly observed in peripheral arteries [19, 20].

2.2 Heavily calcified plaques are stable

Nowadays, increasing data indicates that heavily calcified plaques, with sheets of calcification or ossification, are stable, in contrast to plaques with small and diffuse calcifications (reviewed in [23, 20, 21, 24]). Indeed, intravascular ultrasound (IVUS) imaging showed that vulnerable plaques are characterized by the presence of spotty calcifications [25]. This was confirmed by optical coherence tomography (OCT) studies, which reported that plaque rupture correlates positively with the number of spotty calcifications, but negatively with the number of large calcium deposits [26, 27]. Although IVUS and OCT cannot give precise information on calcification size, these studies collectively suggested that small and diffuse calcifications are more dangerous than fewer and bigger ones (reviewed in [24]). This paradigm seems strengthened by a recent histological study of 687 symptomatic or asymptomatic human carotid plaques revealing that microcalcifications were predominantly observed in unstable plaques, whereas macrocalcifications were present in stable ones [28]. The paradigm that strongly calcified plaques are stable has been further bolstered by the effects of statins on plaque development. It is now well-accepted that statins reduce adverse clinical cardiovascular events [29, 30], and relatively recent IVUS imaging studies revealed that statins decrease plaque surface but increase their calcification [31, 32], which was confirmed by computed tomography and magnetic resonance imaging [33-37]. More recently, administration of pravastatin to apolipoprotein (*ApoE*)-deficient mice for 10 weeks resulted in a coalescence of microcalcifications into bigger calcifications [38]. Contrary to the amount of lipids, the mechanical impact of macrocalcifications on plaque stability is probably more stabilizing than harmful [39].

2.3 Microcalcifications are harmful

Microcalcifications measuring less than 50 μm and invisible with conventional imaging approaches were suggested to provoke plaque rupture by the Weinbaum's group 15 years ago. Using *in vitro* approaches they proposed that microcalcifications originating in the necrotic core are not dangerous, since they are essentially floating debris; however, those that form in the fibrous cap are particularly harmful because they generate a mechanical stress on the cap [40]. In fact, nearly all fibrous caps contain microcalcifications smaller than 5 μm , but only those that will grow above 10 μm may exert dangerous mechanical stress [22]. In addition, microcalcifications might not be dangerous only by exerting mechanical stress, but also by triggering and/or amplifying plaque inflammation. Using ^{18}F -sodium fluoride PET/computed tomography (^{18}F -NaF-PET), Joshi and colleagues reported that microcalcifications were associated with macrophage infiltration and apoptosis in culprit plaques in carotid endarterectomy specimens from patients with symptomatic carotid disease [41]. Moreover, the number of coronary microcalcifications was shown by OCT to be positively associated with the presence of macrophages [42]. Interestingly, as plaque calcification progresses, macrophage infiltration decreases and plaques become less symptomatic [43, 44]. Understanding how microcalcifications form and evolve towards bigger but less dangerous calcifications, and the relative contribution of VSMCs and macrophages is therefore crucial [23, 45].

3- Inflammation induces microcalcification

Experimental data in humans and animal models suggest that inflammation triggers microcalcification. For instance, a clinical study with ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG)-PET conducted on 137 patients revealed that arterial inflammation precedes calcium deposition at the same location [46]. In addition, a very recent study using single photon emission computed tomography (SPECT)/CT imaging revealed that there was an inverse correlation between inflammation and calcification volume in highly calcified

human plaques [47], supporting the notion that inflammation precedes calcification [46]. Similarly, in *ApoE*-deficient mice, dual near-infrared spectroscopy imaging of both macrophages and calcium also revealed that inflammation precedes calcification [48]. To date, several cellular and molecular mechanisms have been proposed to explain the mechanism by which inflammation triggers plaque calcification.

3.1 Macrophages themselves may induce calcification

3.1.1 Macrophages may induce calcification through cell apoptosis/necrosis

It is well known that cell necrosis is a potent inducer of pathological calcification [49]. In fact, calcifying dead macrophages in the necrotic core are often where microcalcifications initiate in human coronary arteries [21]. Extracellular concentrations of calcium and inorganic phosphate (P_i) are close to those that cause spontaneous precipitation in many biological fluids. Hence, calcification is constantly inhibited by the production of extracellular inhibitors, such as inorganic pyrophosphate (PP_i) or matrix Gla protein (MGP). Genetic deficiency in MGP, or in ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 (NPP1), an enzyme generating PP_i from extracellular adenosine triphosphate, results in spontaneous vascular calcification [50, 51]. Inside living cells, calcium and phosphate ions are normally physically separated to prevent the precipitation of calcium phosphate crystals. While calcium is stored in the endoplasmic reticulum and mitochondria, inorganic phosphate (P_i) is mainly located in the cytoplasm where calcium levels are very low [52]. This separation is normally preserved during apoptosis, during which apoptotic bodies that are phagocytosed by macrophages are not calcified. However, when apoptotic body clearance is delayed, apoptotic cells and bodies undergo secondary necrosis during which membranes can break allowing calcium and P_i to interact and precipitate. It is well-known that compromised macrophage phagocytosis of apoptotic bodies is a hallmark of atherosclerosis plaques [11], which might significantly contribute to the formation of early

microcalcifications [21]. Finally, not only the release of P_i but that of organic phosphates might also participate in initiation of plaque calcification [53]. The release of DNA in particular could be involved in microcalcification induced by cell necrosis [54].

In addition, a form of programmed cell necrosis, called necroptosis, has recently emerged [55], and has been shown to profoundly modulate the development of atherosclerotic plaques [56-58]. The main proteins controlling this form of cell death are receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1) and RIPK3 [55]. When activated, RIPK3 phosphorylates mixed-lineage kinase domain-like (MLKL) protein, which triggers MLKL oligomerization, membrane translocation and formation of a pore allowing the extracellular release of intracellular molecules [59]. MLKL is phosphorylated in advanced but not early human atherosclerotic plaques [58], indicating that necroptosis is effective in advanced human plaque development. Among the different cell types present in plaques and potentially affected by necroptosis, macrophages have focused most studies. Macrophage necroptosis is induced *in vitro* by oxidized LDL and caspase inhibitors [56, 58], and *in vivo* *Ripk3* deletion reduces the number of necrotic macrophages in plaques of *ApoE*-deficient mice [56]. To our knowledge, whether macrophage necroptosis is associated with plaque calcification has not been addressed specifically, and it was tempting to speculate that necroptosis induces and/or exacerbates calcification by releasing P_i through MLKL pores. However, the contribution of macrophage necroptosis to plaque development, including calcification and inflammation might be much more complex than anticipated and difficult to characterize. Surprisingly enough, *Ripk3* deletion specifically in macrophages resulted in increased atherosclerotic plaque size [60]. The authors suspected that RIPK3 plays additional roles than promoting necroptosis and particularly anti-inflammatory functions explaining the increased lesion development. Additional studies are therefore warranted to have a clearer view of necroptosis impact, and its effects on calcification.

3.1.2 Macrophages may induce calcification through the release of vesicles

Alternatively, or in addition, macrophages may release calcifying extracellular vesicles (EVs). In the aorta of *ApoE*-deficient mice, electron microscopy demonstrated the presence of crystals in EVs, and near-infrared imaging revealed strong colocalization between macrophages and calcification [48]. EVs released by macrophages may share several features with matrix vesicles (MVs), which are emitted by hypertrophic chondrocytes to initiate apatite crystal nucleation in growth plate cartilage (reviewed in [61]). MVs are released by membrane budding and are thought to accumulate calcium and P_i in their lumen and to allow the nucleation of the first apatite crystals owing to a nucleation core composed of phosphatidylserine and annexins [62]. In addition, their membrane is enriched with glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), the enzyme that hydrolyzes PP_i , allowing crystals that have moved to the extracellular milieu to grow and multiply in association with the collagen matrix [63-65]. In fact, macrophages have been shown to release EVs, which contain phosphatidylserine and annexin V [66], suggesting that they may induce calcification by releasing EVs similar to MVs. Interestingly, in low density lipoprotein receptor (*Ldlr*)-deficient mice, VSMC-specific deletion of *RUNX2*, the transcription factor governing the differentiation of hypertrophic chondrocytes and osteoblasts, only partly prevents plaque calcification [67], suggesting that other cells than VSMCs transdifferentiated into osteochondrocyte-like cells are responsible for calcification in this model. Among the candidate cells, cells expressing CD68, a marker of macrophages, were found to express *RUNX2* [67]. This may suggest that macrophages transdifferentiated from VSMCs [4-7] have some *RUNX2* activity, or that macrophages can change their phenotype towards a phenotype of mineralizing cells.

3.2 Macrophages may stimulate VSMCs to mineralize

3.2.1 Macrophages may stimulate VSMCs to transdifferentiate into osteochondrocyte-like cells

VSMCs in atherosclerotic plaques have the ability to transdifferentiate into osteochondrocyte-like cells. In *ApoE*-deficient mice, calcification proceeds through a process similar to endochondral ossification, with chondrocyte differentiation [68]. In these mice, like in *Ldlr*-deficient mice, VSMC-specific deletion of *RUNX2* significantly reduces calcification [69, 67], demonstrating that VSMCs transdifferentiate to chondrocytes and maybe osteoblasts in order to mineralize plaques. Since the pioneer report by Tintut and Demer that TNF- α stimulates VSMCs to express TNAP and mineralize [70], many articles confirmed that inflammatory cytokines such as TNF- α , but also interleukin (IL)-1 β or IL-6 stimulate calcification in VSMC cultures (reviewed in [71]). TNF- α activates VSMCs to transdifferentiate into osteochondrocyte-like cells, expressing the transcription factor *RUNX2* and several markers of mineralizing cells [72-74]. Since macrophages stimulate VSMCs to mineralize in part through TNF- α *in vitro* [75, 74], it is likely that VSMCs in plaques are also stimulated to mineralize by TNF- α released from macrophages. Moreover, a recent study suggested that endogenously produced IL-1 β is involved in VSMC calcification [76].

Considerable amount of *in vitro* data demonstrates that inflammatory cytokines stimulate VSMCs to transdifferentiate into chondrocytes, which in turn mature into *RUNX2*-expressing hypertrophic cells to induce microcalcification owing to their TNAP activity (Figure 1A). Although this model fits very well with data in mice, it cannot be applied to humans. Indeed, plaque ossification in humans occurs in peripheral arteries but much less in coronaries or carotids [19-21], and relies probably on intramembranous mechanisms (without a cartilage template), rather than on endochondral ones (with a cartilage template) [77]. Moreover, in coronary arteries, expression of osteochondrocyte markers seems to occur after microcalcification, suggesting that VSMC transdifferentiation is a consequence, and not a cause of microcalcification [78, 79].

3.2.2 Macrophages may stimulate VSMCs to calcify independently from their transdifferentiation into osteochondrocyte-like cells

TNF- α , and possibly other pro-inflammatory cytokines, may stimulate VSMCs to mineralize independently of their transdifferentiation into mineralizing cells (Figure 1A). For instance, TNF- α decreases the expression of the PP_i transporter ANKH and reduces PP_i export in VSMCs [80]. This might be sufficient to trigger calcification because genetic deficiency of ANK (the mouse ortholog of ANKH) leads to soft tissue calcification [81]. Moreover, TNF- α decreases extracellular PP_i levels through TNAP activation [82]. It is worth mentioning that TNAP expression and function are not restricted to PP_i removal in mineralized tissues, and in particular that TNAP exerts functions in inflammation [83-86]. Interestingly, TNAP expression is stimulated by TNF- α or IL-1 β in human mesenchymal stem cells (MSCs), resulting in increased mineralization, while the expression of RUNX2 and its transcriptional targets is robustly inhibited [87]. In addition, TNF- α may stimulate calcification in VSMCs by decreasing the expression of another important calcification inhibitor, MGP [50, 74, 88].

4- Microcalcifications exacerbate inflammation

4.1 Calcium phosphate crystals activate macrophages to produce inflammatory cytokines

Calcium phosphate crystals measuring less than 1 μm activate macrophages to release TNF- α , IL-1 β and IL-8 [89] (Figure 1B). Crystals are phagocytosed by macrophages [89], and the smallest ones are the most potent to stimulate TNF- α secretion [90], suggesting that they increase TNF- α production at least in part after internalization. While the mechanisms through which crystals activate TNF- α remain obscure those involved in the secretion of IL-1 β are better understood. Crystals activate IL-1 β secretion both in human and mouse macrophages through NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome [91, 92]. NLRP3 consists of a N-terminal pyrin domain (PYD), a central NACHT domain, and a C-terminal leucine-rich repeats (LRR). Upon cellular stress, the LRR domain exposes the NACHT domain that is responsible for homotypic oligomerization, leading to NLRP3 interaction with

the adaptor protein ASC, culminating with caspase-1 binding and activation. The latter cleaves the 31 kDa precursor form of IL-1 β into its 17 kDa mature form. Caspase-1 also cleaves gasdermin D, inducing its oligomerization, association with the membrane and opening of a channel through which IL-1 β among other molecules is released extracellularly [93]. Several different organic and inorganic crystals are potent NLRP3 activators, such as monosodium urate, silica, cholesterol crystals and calcium phosphate crystals. This suggests that it is the inherent repetitive structure of crystals, rather than their composition that is involved in NLRP3 activation. Crystals are thought to activate NLRP3 by triggering potassium efflux following their internalization [94], but potassium efflux induced by membrane deformation without internalization has also been proposed to be sufficient to activate NLRP3-dependent IL-1 β production [95]. Thus, macrophages stimulated by crystals may activate VSMCs through the release of inflammatory mediators. Whether they may also stimulate VSMCs to transdifferentiate through the release of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) is a question that merits investigation. Indeed, inhibition of RANKL-RANK signaling with osteoprotegerin reduces plaque calcification [96, 97] and RANKL reverse signaling has recently been shown to activate osteoblast differentiation and bone formation [98].

4.2 Calcium phosphate crystals are pro-inflammatory on VSMCs

Although VSMCs are not specialized to secrete pro-inflammatory molecules, they may secrete cytokines in response to microcalcifications (Figure 1B). Indeed, similar to macrophages, VSMCs release IL-1 β in presence of calcium phosphate crystals [99]. Moreover, VSMCs secrete more IL-1 β as they progress toward senescence [99], which occurs frequently in human plaques [100]. In this case, IL-1 β release relies on crystal endocytosis and caspase-1 activity, but maybe not on NLRP3 activation. In fact, other treatments known to activate NLRP3-dependent IL-1 β secretion in monocytes/macrophages, such as monosodium urate, nigericin, or ATP, fail to induce IL-1 β release in VSMCs [99]. In addition to triggering IL-1 β secretion, long term treatment of human VSMCs with

calcium phosphate crystals triggers crystal endocytosis and induces cell death [101]. VSMC apoptotic death is frequently followed by secondary necrosis and the release of the alarmin IL-1 α , which exacerbates plaque inflammation [102]. Finally, in a last pathological step, apoptotic bodies released by dying VSMCs may constitute a nidus for new calcification to occur [103], further amplifying inflammation.

5- An unstoppable vicious cycle of calcification and inflammation, or efforts to resolve inflammation and repair?

5.1 Macrophages and VSMCs try to stop pathological calcification and remove crystals

Monocytes and macrophages were recently shown to produce γ -carboxylated MGP and Gla-rich protein (GRP) [104] (Figure 1C). Indeed, not only MGP but also GRP acts as an inhibitor of vascular calcification [105, 106]. Moreover, macrophages release more GRP and MGP in addition to producing more γ -glutamyl carboxylase, the enzyme responsible for their γ -carboxylation, in presence of inflammatory molecules or hydroxyapatite crystals [104]. It is largely conceivable that the same effects occur in human atherosclerotic plaques, where the presence of microcalcifications correlate with that of macrophages and carboxylated MGP [78, 79]. In addition, VSMCs also produce osteopontin (OPN) in response to calcium phosphate crystals [107, 108]. OPN is an inducible inhibitor of ectopic calcification [109], whose activity relies on its phosphorylation status [110]. Phosphorylated OPN binds to crystals and inhibits their growth. OPN stimulates macrophages to phagocyte crystals [111], like it stimulates osteoclasts to promote bone resorption [112]. Logically, OPN deficiency in *ApoE*-deficient atherosclerotic mice leads to the development of more calcified plaques [113].

5.2 Crystals induce VSMCs to transdifferentiate into chondrocytes to build cartilage

If as explained above, crystals exert pro-inflammatory effects on VSMCs, they also stimulate VSMCs to produce cartilage to repair a disorganized calcified tissue (Figure 1C). Apatite crystals stimulate VSMCs to produce BMP2, a potent bone anabolic growth factor [107, 114, 115]. Inhibition of endogenous BMP2 effects by the addition of Noggin in VSMC cultures results in blocking the increase in chondrocyte markers stimulated by apatite crystals [115]. The shape of the latter may have little importance since rods, needles, plates or spheres all increased RUNX2 protein levels [108]. Interestingly, not only does the MGP knockout mouse model leads to vascular calcification in absence of atherosclerosis, but also it leads to cartilage metaplasia in the vasculature [50]. A thorough time-course examination of arterial calcification revealed that chondrocytes differentiate after initiation of calcification [116], suggesting that cartilage metaplasia is a cellular response permitting the transformation of a pathologically, pro-inflammatory calcified tissue into a more stable one (Figure 2).

5.3 Crystal induction of inflammation and cartilage formation: any similarity with bone fracture healing?

The evolution from a disorganized, pro-inflammatory tissue containing apatite crystals, toward building a new mineralized tissue may not only occur in atherosclerosis plaques but also in bone after a fracture. Indeed, fracture healing initiates with an early inflammatory phase, which takes place just after the fracture, and is necessary to induce ossification thereafter [117]. Absence of TNF- α in particular delays ossification [118], in part by delaying chondrocyte differentiation [119]. Interestingly, TNF- α may act mainly through BMP2 since TNF- α stimulates BMP2 expression in chondrocytes [120] and endothelial cells [121], and since the absence of BMP2 blocks fracture healing in its early steps [122]. Therefore, it is possible that the inflammatory effects of apatite crystals in atherosclerosis plaques are necessary to generate osteochondrocyte-like cells that will produce large mineralized surfaces allowing plaque stabilization. The recent histological study in human carotids published by Montanaro et al. [28] suggests that TGF- β expressed by M2 macrophages may also link the resolution

of inflammation to the differentiation of osteochondrocyte-like cells and the growth of macrocalcifications. Therefore, M1 macrophages may participate in the vicious cycle linking microcalcification to inflammation, whereas M2 macrophages may contribute to terminate this cycle and allow plaque repair through ossification. The localization of macrophages in atherosclerotic plaques supports this hypothesis. The pro-inflammatory M1 cells are located in unstable rupture-prone plaque while the anti-inflammatory M2 macrophages are mostly present in vascular adventitia, far from the lipid core, and more stable regions of the plaque [123-125]. M1 macrophages show increased lipid accumulation, mitochondrial dysfunction, destabilized lysosomes, activated oxidative stress, defective efferocytosis and elevated release of pro-inflammatory mediators such as IL-6, IL-12, IL-1 β and TNF- α , as well as ROS. On the other hand, M2 cells enclose small lipid droplets and are supposed to stimulate atherosclerosis regression through several mechanisms including supplementation of anti-inflammatory factors (IL-10 and TGF β), clearance of dying cells through efferocytosis and tissue repair following collagen formation and angiogenesis [126]. Collectively, these data suggest that the balance between M1 and M2 macrophages might play a crucial role in the transition from pro-inflammatory plaques with microcalcifications to resolution of inflammation associated with plaque macrocalcification. Interestingly, a similar role for M1 and M2 macrophages is also strongly suspected during bone fracture healing (reviewed in [127]).

We consider important in future experiments to thoroughly characterize how inflammation, calcification and/or ossification are interconnected in atherosclerotic plaques. The emerging treatments targeting IL-1 β will likely impact this association, with beneficial and/or detrimental consequences. Anti-IL-1 β therapies are efficient in reducing inflammation and calcification in mice [128] as well as recurrent cardiovascular events in patients [129]. However, a recent study indicated that IL-1 β inhibition induces negative effects on advanced atherosclerotic plaques, and that IL-1 β exerts its protective effects acting both on VSMCs and macrophages [130]. Whether calcification is

impacted differently when IL-1 β is inhibited in early versus advanced plaques is not known but deserves particular attention.

In conclusion, a huge amount of data highlights the strong interrelationship between inflammation and calcification in atherosclerotic plaques, with inflammation playing an important role in calcium deposition, and calcifications exacerbating inflammation. However, efforts still remain to be done to better understand whether and how inflammation, or its resolution, impacts plaque macrocalcification leading to plaque stabilization.

Statement of Ethics: not applicable

Conflict of Interest Statement: the authors have no conflict of interest to declare.

Funding: We acknowledge financial support from the European Research Area Network on Cardiovascular Diseases (ERA-NET CVD, Microexploration project 2018-2021) to work on atherosclerotic plaque microcalcification.

Author's contribution: DM designed the article, wrote most chapters and revised the manuscript; LK wrote the chapter on atherosclerosis inflammation; LB reviewed the article and wrote the part on VSMC phenotypic changes; HI drew the figures; EH and KZ wrote the chapter on M1/M2 macrophages and revised the manuscript.

List of abbreviations: AB: apoptotic body; ApoE: apolipoprotein E; BMP: bone morphogenetic protein; CAC: coronary artery calcium; CCL2: C-C motif ligand 2; EV: extracellular vesicle; FDG: fluorodeoxyglucose; GRP: Gla-rich protein; IFN: interferon; IL: interleukin; IVUS: intravascular ultrasound; Ldlr: low density lipoprotein receptor; MGP: matrix Gla protein; MV: matrix vesicle; NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; NPP1: ectonucleotide pyrophosphatase

phosphodiesterase 1; OCT: optical coherence tomography; OPN: osteopontin; PET: positron emission tomography; PPI: inorganic pyrophosphate; RIPK: receptor interacting protein kinase; ROS: reactive oxygen species; SPECT: single photon emission computed tomography; TGF: transforming growth factor; TNAP: tissue-nonspecific alkaline phosphatase; TNF: tumor necrosis factor; VCAM: vascular cell adhesion molecule; VSMC: vascular smooth muscle cell.

References

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
2. Ghattas A, Griffiths HR, Devitt A, Lip GY, Shantsila E. Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now? *J Am Coll Cardiol*. 2013 Oct;62(17):1541-51.
3. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11;100(23):13531-6.
4. Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation*. 2014 Apr 15;129(15):1551-9.
5. Feil S, Fehrenbacher B, Lukowski R, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Schaller M, et al. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circ Res*. 2014 Sep 12;115(7):662-7.
6. Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, et al. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med*. 2015 Jun;21(6):628-37.
7. Wang Y, Dubland JA, Allahverdian S, Asonye E, Sahin B, Jaw JE, et al. Smooth Muscle Cells Contribute the Majority of Foam Cells in ApoE (Apolipoprotein E)-Deficient Mouse Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019 05;39(5):876-87.
8. Ivanova EA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Intimal pericytes as the second line of immune defence in atherosclerosis. *World J Cardiol*. 2015 Oct 26;7(10):583-93.
9. Legein B, Temmerman L, Biessen EA, Lutgens E. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013 Oct;70(20):3847-69.
10. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol*. 2003 Sep;5(9):781-92.
11. Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jun;25(6):1256-61.
12. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 1991 Sep-Oct;11(5):1223-30.
13. Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*. 1999 May;99(19):2503-9.
14. Horton DB, Libby P, Schonbeck U. Ligation of CD40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Dec;947:329-36.
15. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol*. 2010 Sep;7(9):528-36.
16. Doherty TM, Fitzpatrick LA, Inoue D, Qiao JH, Fishbein MC, Detrano RC, et al. Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):629-72.
17. Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA*. 2004 Jan;291(2):210-5.
18. Agatston AS, Janowitz WR, Kaplan G, Gasso J, Hildner F, Viamonte M. Ultrafast computed tomography-detected coronary calcium reflects the angiographic extent of coronary arterial atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1994 Dec;74(12):1272-4.

19. Herisson F, Heymann MF, Chétiveaux M, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, et al. Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis*. 2011 Jun;216(2):348-54.
20. Mori H, Torii S, Kutyna M, Sakamoto A, Finn AV, Virmani R. Coronary Artery Calcification and its Progression: What Does it Really Mean? *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018 01;11(1):127-42.
21. Jinnouchi H, Sato Y, Sakamoto A, Cornelissen A, Mori M, Kawakami R, et al. Calcium deposition within coronary atherosclerotic lesion: Implications for plaque stability. *Atherosclerosis*. 2020 Jun.
22. Kelly-Arnold A, Maldonado N, Laudier D, Aikawa E, Cardoso L, Weinbaum S. Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun;110(26):10741-6.
23. Pugliese G, Iacobini C, Blasetti Fantauzzi C, Menini S. The dark and bright side of atherosclerotic calcification. *Atherosclerosis*. 2015 Feb;238(2):220-30.
24. Shi X, Gao J, Lv Q, Cai H, Wang F, Ye R, et al. Calcification in Atherosclerotic Plaque Vulnerability: Friend or Foe? *Front Physiol*. 2020;11:56.
25. Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, et al. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation*. 2004 Nov;110(22):3424-9.
26. Mizukoshi M, Kubo T, Takarada S, Kitabata H, Ino Y, Tanimoto T, et al. Coronary superficial and spotty calcium deposits in culprit coronary lesions of acute coronary syndrome as determined by optical coherence tomography. *Am J Cardiol*. 2013 Jul;112(1):34-40.
27. Sakaguchi M, Hasegawa T, Ehara S, Matsumoto K, Mizutani K, Iguchi T, et al. New insights into spotty calcification and plaque rupture in acute coronary syndrome: an optical coherence tomography study. *Heart Vessels*. 2016 Dec;31(12):1915-22.
28. Montanaro M, Scimeca M, Anemona L, Servadei F, Giacobbi E, Bonfiglio R, et al. The Paradox Effect of Calcification in Carotid Atherosclerosis: Microcalcification is Correlated with Plaque Instability. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan;22(1).
29. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, et al. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001 Apr;285(13):1711-8.
30. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2004 Apr;350(15):1495-504.
31. Banach M, Serban C, Sahebkar A, Mikhailidis DP, Ursoniu S, Ray KK, et al. Impact of statin therapy on coronary plaque composition: a systematic review and meta-analysis of virtual histology intravascular ultrasound studies. *BMC Med*. 2015 Sep;13:229.
32. Puri R, Nicholls SJ, Shao M, Kataoka Y, Uno K, Kapadia SR, et al. Impact of statins on serial coronary calcification during atheroma progression and regression. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Apr;65(13):1273-82.
33. Nakazato R, Gransar H, Berman DS, Cheng VY, Lin FY, Achenbach S, et al. Statins use and coronary artery plaque composition: results from the International Multicenter CONFIRM Registry. *Atherosclerosis*. 2012 Nov;225(1):148-53.
34. Lee SE, Chang HJ, Sung JM, Park HB, Heo R, Rizvi A, et al. Effects of Statins on Coronary Atherosclerotic Plaques: The PARADIGM Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018 10;11(10):1475-84.
35. Mujaj B, Bos D, Selwaness M, Leening MJG, Kavousi M, Wentzel JJ, et al. Statin use is associated with carotid plaque composition: The Rotterdam Study. *Int J Cardiol*. 2018 06;260:213-18.
36. Lee SE, Sung JM, Andreini D, Budoff MJ, Cademartiri F, Chinnaiyan K, et al. Differential association between the progression of coronary artery calcium score and coronary plaque volume progression according to statins: the Progression of Atherosclerotic Plaque

- Determined by Computed Tomographic Angiography Imaging (PARADIGM) study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2019 Nov;20(11):1307-14.
37. Healy A, Berus JM, Christensen JL, Lee C, Mantsounga C, Dong W, et al. Statins Disrupt Macrophage Rac1 Regulation Leading to Increased Atherosclerotic Plaque Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 03;40(3):714-32.
 38. Xian JZ, Lu M, Fong F, Qiao R, Patel NR, Abeydeera D, et al. Statin Effects on Vascular Calcification: Microarchitectural Changes in Aortic Calcium Deposits in Aged Hyperlipidemic Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 04;41(4):e185-e92.
 39. Huang H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT. The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2001 Feb;103(8):1051-6.
 40. Vengrenyuk Y, Carlier S, Xanthos S, Cardoso L, Ganatos P, Virmani R, et al. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct;103(40):14678-83.
 41. Joshi NV, Vesey AT, Williams MC, Shah AS, Calvert PA, Craighead FH, et al. (18)F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: a prospective clinical trial. *Lancet*. 2013 Nov.
 42. Reith S, Milzi A, Dettori R, Marx N, Burgmaier M. Predictors for target lesion microcalcifications in patients with stable coronary artery disease: an optical coherence tomography study. *Clin Res Cardiol*. 2018 Sep;107(9):763-71.
 43. Shaalan WE, Cheng H, Gewertz B, McKinsey JF, Schwartz LB, Katz D, et al. Degree of carotid plaque calcification in relation to symptomatic outcome and plaque inflammation. *J Vasc Surg*. 2004 Aug;40(2):262-9.
 44. Mauriello A, Servadei F, Zoccai GB, Giacobbi E, Anemona L, Bonanno E, et al. Coronary calcification identifies the vulnerable patient rather than the vulnerable Plaque. *Atherosclerosis*. 2013 Jul;229(1):124-9.
 45. Hénaut L, Candellier A, Boudot C, Grissi M, Mentaverri R, Choukroun G, et al. New Insights into the Roles of Monocytes/Macrophages in Cardiovascular Calcification Associated with Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel)*. 2019 09;11(9).
 46. Abdelbaky A, Corsini E, Figueroa AL, Fontanez S, Subramanian S, Ferencik M, et al. Focal Arterial Inflammation Precedes Subsequent Calcification in the Same Location: A Longitudinal FDG-PET/CT Study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2013 Jul;6(5):747-54.
 47. Van der Heiden K, Barrett HE, Meester EJ, van Gaalen K, Krenning BJ, Beekman FJ, et al. SPECT/CT imaging of inflammation and calcification in human carotid atherosclerosis to identify the plaque at risk of rupture. *J Nucl Cardiol*. 2021 Jul 27.
 48. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*. 2007 Dec;116(24):2841-50.
 49. Kim KM. Apoptosis and calcification. *Scanning Microsc*. 1995;9(4):1137-75; discussion 75-8.
 50. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997 Mar;386(6620):78-81.
 51. Nitschke Y, Baujat G, Botschen U, Wittkampf T, du Moulin M, Stella J, et al. Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6. *Am J Hum Genet*. 2012 Jan;90(1):25-39.
 52. Romero-Garcia S, Prado-Garcia H. Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review). *Int J Oncol*. 2019 Apr;54(4):1155-67.
 53. Bäck M, Michel JB. From organic and inorganic phosphates to valvular and vascular calcifications. *Cardiovasc Res*. 2021 Jul 27;117(9):2016-29.
 54. Coscas R, Bensussan M, Jacob MP, Louedec L, Massy Z, Sadoine J, et al. Free DNA precipitates calcium phosphate apatite crystals in the arterial wall in vivo. *Atherosclerosis*. 2017 04;259:60-67.

55. Choi ME, Price DR, Ryter SW, Choi AMK. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight*. 2019 08;4(15).
56. Lin J, Li H, Yang M, Ren J, Huang Z, Han F, et al. A role of RIP3-mediated macrophage necrosis in atherosclerosis development. *Cell Rep*. 2013 Jan;3(1):200-10.
57. Meng L, Jin W, Wang X. RIP3-mediated necrotic cell death accelerates systematic inflammation and mortality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Sep;112(35):11007-12.
58. Karunakaran D, Geoffrion M, Wei L, Gan W, Richards L, Shangari P, et al. Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis. *Sci Adv*. 2016 07;2(7):e1600224.
59. Kolbrink B, Riebeling T, Kunzendorf U, Krautwald S. Plasma Membrane Pores Drive Inflammatory Cell Death. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:817.
60. Colijn S, Muthukumar V, Xie J, Gao S, Griffin CT. Cell-specific and athero-protective roles for RIPK3 in a murine model of atherosclerosis. *Dis Model Mech*. 2020 01;13(1).
61. Bottini M, Mebarek S, Anderson KL, Strzelecka-Kiliszek A, Bozycki L, Simão AMS, et al. Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2018 Mar;1862(3):532-46.
62. Wu LN, Yoshimori T, Genge BR, Sauer GR, Kirsch T, Ishikawa Y, et al. Characterization of the nucleational core complex responsible for mineral induction by growth plate cartilage matrix vesicles. *J Biol Chem*. 1993 Nov;268(33):25084-94.
63. Hesse L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul;99(14):9445-9.
64. Harmey D, Hesse L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millán JL. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol*. 2004 Apr;164(4):1199-209.
65. Murshed M, Harmey D, Millán JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev*. 2005 May;19(9):1093-104.
66. New SE, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, et al. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res*. 2013 Jun;113(1):72-7.
67. Lin ME, Chen TM, Wallingford MC, Nguyen NB, Yamada S, Sawangmake C, et al. *Runx2* deletion in smooth muscle cells inhibits vascular osteochondrogenesis and calcification but not atherosclerotic lesion formation. *Cardiovasc Res*. 2016 Nov;112(2):606-16.
68. Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, Kirk EA, Ricks JL, Speer M, et al. Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jul;25(7):1420-5.
69. Sun Y, Byon CH, Yuan K, Chen J, Mao X, Heath JM, et al. Smooth muscle cell-specific *runx2* deficiency inhibits vascular calcification. *Circ Res*. 2012 Aug;111(5):543-52.
70. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor- α promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation*. 2000 Nov;102(21):2636-42.
71. Bessueille L, Magne D. Inflammation: a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Mar.
72. Villa-Bellosta R, Levi M, Sorribas V. Vascular smooth muscle cell calcification and SLC20 inorganic phosphate transporters: effects of PDGF, TNF- α , and Pi. *Pflugers Arch*. 2009 Oct;458(6):1151-61.
73. Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Baek JH. Tumor necrosis factor- α increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan;391(1):1087-92.
74. Deuell KA, Callegari A, Giachelli CM, Rosenfeld ME, Scatena M. RANKL enhances macrophage paracrine pro-calcific activity in high phosphate-treated smooth muscle cells: dependence on IL-6 and TNF- α . *J Vasc Res*. 2012;49(6):510-21.

75. Shioi A, Katagi M, Okuno Y, Mori K, Jono S, Koyama H, et al. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor- α and oncostatin M derived from macrophages. *Circ Res*. 2002 Jul;91(1):9-16.
76. Wen C, Yang X, Yan Z, Zhao M, Yue X, Cheng X, et al. Nalp3 inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification. *Int J Cardiol*. 2013 Oct;168(3):2242-7.
77. Aigner T, Neureiter D, Câmpean V, Soder S, Amann K. Expression of cartilage-specific markers in calcified and non-calcified atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 2008 Jan;196(1):37-41.
78. Roijers RB, Debernardi N, Cleutjens JP, Schurgers LJ, Mutsaers PH, van der Vusse GJ. Microcalcifications in early intimal lesions of atherosclerotic human coronary arteries. *Am J Pathol*. 2011 Jun;178(6):2879-87.
79. Chatrou ML, Cleutjens JP, van der Vusse GJ, Roijers RB, Mutsaers PH, Schurgers LJ. Intra-Section Analysis of Human Coronary Arteries Reveals a Potential Role for Micro-Calcifications in Macrophage Recruitment in the Early Stage of Atherosclerosis. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142335.
80. Zhao G, Xu MJ, Zhao MM, Dai XY, Kong W, Wilson GM, et al. Activation of nuclear factor- κ B accelerates vascular calcification by inhibiting ankylosis protein homolog expression. *Kidney Int*. 2012 Jul;82(1):34-44.
81. Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science*. 2000 Jul;289(5477):265-70.
82. Lencel P, Delplace S, Pilet P, Leterme D, Miellot F, Sourice S, et al. Cell-specific effects of TNF- α and IL-1 β on alkaline phosphatase: implication for syndesmophyte formation and vascular calcification. *Lab Invest*. 2011 Oct;91(10):1434-42.
83. Pettengill M, Robson S, Tresenriter M, Millán JL, Usheva A, Bingham T, et al. Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *J Biol Chem*. 2013 Sep;288(38):27315-26.
84. Pettengill M, Matute JD, Tresenriter M, Hibbert J, Burgner D, Richmond P, et al. Human alkaline phosphatase dephosphorylates microbial products and is elevated in preterm neonates with a history of late-onset sepsis. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175936.
85. Gámez-Belmonte R, Hernández-Chirlaque C, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustin O. Experimental acute pancreatitis is enhanced in mice with tissue nonspecific alkaline phosphatase haploinsufficiency due to modulation of neutrophils and acinar cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018 11;1864(11):3769-79.
86. Bessueille L, Briolay A, Como J, Mebarek S, Mansouri C, Gleizes M, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is an anti-inflammatory nucleotidase. *Bone*. 2020 Apr;133:115262.
87. Ding J, Ghali O, Lencel P, Broux O, Chauveau C, Devedjian JC, et al. TNF- α and IL-1 β inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci*. 2009 Apr;84(15-16):499-504.
88. Ikeda K, Souma Y, Akakabe Y, Kitamura Y, Matsuo K, Shimoda Y, et al. Macrophages play a unique role in the plaque calcification by enhancing the osteogenic signals exerted by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Aug;425(1):39-44.
89. Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CD, McCarthy GM, et al. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res*. 2005 Jun;96(12):1248-56.
90. Nadra I, Boccaccini AR, Philippidis P, Whelan LC, McCarthy GM, Haskard DO, et al. Effect of particle size on hydroxyapatite crystal-induced tumor necrosis factor alpha secretion by macrophages. *Atherosclerosis*. 2008 Jan;196(1):98-105.
91. Jin C, Frayssinet P, Pelker R, Cwirka D, Hu B, Vignery A, et al. NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Sep;108(36):14867-72.

92. Pazár B, Ea HK, Narayan S, Kolly L, Bagnoud N, Chobaz V, et al. Basic calcium phosphate crystals induce monocyte/macrophage IL-1 β secretion through the NLRP3 inflammasome in vitro. *J Immunol*. 2011 Feb;186(4):2495-502.
93. Wang Y, Liu X, Shi H, Yu Y, Li M, Chen R. NLRP3 inflammasome, an immune-inflammatory target in pathogenesis and treatment of cardiovascular diseases. *Clin Transl Med*. 2020 Jan;10(1):91-106.
94. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019 08;19(8):477-89.
95. Hari A, Zhang Y, Tu Z, Detampel P, Stenner M, Ganguly A, et al. Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact. *Sci Rep*. 2014;4:7281.
96. Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, et al. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE $^{-/-}$ mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Sep;26(9):2117-24.
97. Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D, et al. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr(-/-)* mice. *Circulation*. 2008 Jan 22;117(3):411-20.
98. Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, Hayashi M, Sugamori Y, Khan M, et al. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature*. 2018 09;561(7722):195-200.
99. Dautova Y, Kapustin AN, Pappert K, Epple M, Okkenhaug H, Cook SJ, et al. Calcium phosphate particles stimulate interleukin-1 β release from human vascular smooth muscle cells: A role for spleen tyrosine kinase and exosome release. *J Mol Cell Cardiol*. 2018 02;115:82-93.
100. Grootaert MOJ, Moulis M, Roth L, Martinet W, Vindis C, Bennett MR, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2018 03;114(4):622-34.
101. Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, et al. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res*. 2008 Aug;103(5):e28-34.
102. Clarke MC, Talib S, Figg NL, Bennett MR. Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1-directed inflammation: effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis. *Circ Res*. 2010 Feb;106(2):363-72.
103. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res*. 2000 Nov;87(11):1055-62.
104. Viegas CSB, Costa RM, Santos L, Videira PA, Silva Z, Araújo N, et al. Gla-rich protein function as an anti-inflammatory agent in monocytes/macrophages: Implications for calcification-related chronic inflammatory diseases. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177829.
105. Viegas CS, Cavaco S, Neves PL, Ferreira A, João A, Williamson MK, et al. Gla-rich protein is a novel vitamin K-dependent protein present in serum that accumulates at sites of pathological calcifications. *Am J Pathol*. 2009 Dec;175(6):2288-98.
106. Willems BA, Furmanik M, Caron MMJ, Chatrou MLL, Kusters DHM, Welting TJM, et al. Ucma/GRP inhibits phosphate-induced vascular smooth muscle cell calcification via SMAD-dependent BMP signalling. *Sci Rep*. 2018 03;8(1):4961.
107. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int*. 2011 Feb;79(4):414-22.
108. Huang LH, Han J, Ouyang JM, Gui BS. Shape-dependent adhesion and endocytosis of hydroxyapatite nanoparticles on A7R5 aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 2020 Jan;235(1):465-79.
109. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med*. 2002 Oct;196(8):1047-55.

110. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem*. 2000 Jun;275(26):20197-203.
111. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol*. 2002 Dec;161(6):2035-46.
112. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul;96(14):8156-60.
113. Matsui Y, Rittling SR, Okamoto H, Inobe M, Jia N, Shimizu T, et al. Osteopontin deficiency attenuates atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jun;23(6):1029-34.
114. Nahar-Gohad P, Gohad N, Tsai CC, Bordia R, Vyavahare N. Rat aortic smooth muscle cells cultured on hydroxyapatite differentiate into osteoblast-like cells via BMP-2-SMAD-5 pathway. *Calcif Tissue Int*. 2015 Apr;96(4):359-69.
115. Fakhry M, Roszkowska M, Briolay A, Bougault C, Guignandon A, Diaz-Hernandez JI, et al. TNAP stimulates vascular smooth muscle cell trans-differentiation into chondrocytes through calcium deposition and BMP-2 activation: Possible implication in atherosclerotic plaque stability. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Mar;1863(3):643-53.
116. Khavandgar Z, Roman H, Li J, Lee S, Vali H, Brinckmann J, et al. Elastin haploinsufficiency impedes the progression of arterial calcification in MGP-deficient mice. *J Bone Miner Res*. 2014 Feb;29(2):327-37.
117. Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T, Zhang N, Ueno M, Yao Z, et al. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:386.
118. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, Graves BD, et al. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(3):285-94.
119. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res*. 2003 Sep;18(9):1584-92.
120. Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Hikita A, Tanaka S, Yamane S, et al. Pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha induces bone morphogenetic protein-2 in chondrocytes via mRNA stabilization and transcriptional up-regulation. *J Biol Chem*. 2006 Sep;281(37):27229-41.
121. Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H₂O₂, and high intravascular pressure. *Circulation*. 2005 May;111(18):2364-72.
122. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet*. 2006 Dec;38(12):1424-9.
123. Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhrel MA, Vanhoutte J, Copin C, Sebti Y, et al. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPAR γ and LXR α pathways. *Circ Res*. 2011 Apr 15;108(8):985-95.
124. Stöger JL, Gijbels MJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EA, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012 Dec;225(2):461-8.
125. de Gaetano M, Crean D, Barry M, Belton O. M1- and M2-Type Macrophage Responses Are Predictive of Adverse Outcomes in Human Atherosclerosis. *Front Immunol*. 2016;7:275.
126. Bi Y, Chen J, Hu F, Liu J, Li M, Zhao L. M2 Macrophages as a Potential Target for Antiatherosclerosis Treatment. *Neural Plast*. 2019;2019:6724903.
127. Shioi A, Ikari Y. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression. *J Atheroscler Thromb*. 2018 Apr 01;25(4):294-303.

128. Ceneri N, Zhao L, Young BD, Healy A, Coskun S, Vasavada H, et al. Rac2 Modulates Atherosclerotic Calcification by Regulating Macrophage Interleukin-1 β Production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Feb;37(2):328-40.
129. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 2017 09;377(12):1119-31.
130. Gomez D, Baylis RA, Durgin BG, Newman AAC, Alencar GF, Mahan S, et al. Interleukin-1 β has atheroprotective effects in advanced atherosclerotic lesions of mice. *Nat Med.* 2018 09;24(9):1418-29.

Figure legends

Figure 1: Inflammation and microcalcification in the context of atherosclerosis: A vicious cycle. (A)

Inflammation stimulates microcalcification generation. Inflammation is a key factor that activates calcification formation. Immune cells such as M1 macrophages are key players inducing apatite crystals generation and thus ectopic calcification initiation. For instance, these cells produce calcifying EVs and undergo secondary necrosis due to compromised clearance of apoptotic bodies [11, 66, 21]. Moreover, macrophages stimulate VSMCs reprogramming through liberation of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α . The latter creates an imbalance in favor of calcification promoters such as RUNX2 [70, 72, 74] and TNAP [70, 73]. On the other hand, MGP and ANKH calcification inhibitors are downregulated [73]. Importantly, VSMCs can also produce calcifying EVs and undergo secondary necrosis. (B)

Microcalcification amplifies the inflammatory response. Once initiated, microcalcifications exaggerate the inflammatory response in the context of a positive feedback loop that boosts the mineralization process. In fact, endocytosis of calcium phosphate crystals increases the production of pro-inflammatory mediators by M1 macrophages, such as TNF- α and IL-1 β [89, 90]. Moreover, NLRP3 inflammasome activation by crystals is known to facilitate IL-1 β liberation, by macrophages and VSMCs [91, 92, 99]. Taken together, the resulting pro-inflammatory response amplifies several processes related to microcalcification formation including increased immune cells recruitment, secondary necrosis and EVs production. (C) **Repair mechanisms associated with calcification.** The terminal phase of atherosclerosis is linked with the formation of relatively large and stable calcification deposits that are thought to resolve inflammation. Under such circumstances, macrophages and VSMCs possibly generate calcification inhibitors including MGP, GRP and OPN to prevent additional crystal growth and formation of new calcification sites [107, 104, 108]. On the other hand, VSMCs produce BMP2 which, most probably, activate the transition of VSMCs into chondrocytes resulting into a cartilage like environment that ensures the stability of the calcified tissue [107, 114, 115]. Taken together, these processes are expected to break the vicious inflammation-calcification cycle. Therefore, a focus

towards a better understanding of mineralization repair mechanisms is of a great importance to limit the risk of atherosclerosis induced mortality. ANKH: Progressive ankylosis protein homolog, BMP2: Bone morphogenetic protein 2, EVs: Extracellular vesicles, GRP: Gla rich protein, IL-1 β : Interleukin 1 β , MGP: Matrix Gla protein, NLRP3: Nod-like receptor protein 3, OPN: Osteopontin, RUNX2: **Runt-related transcription factor 2**, TNAP: tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNF- α : Tumor necrosis factor α , VSMCs: Vascular smooth muscle cells.

Figure 2: Macrophages and atherosclerosis evolution: A general overview. (A) Progressive atherosclerotic lesion. During the course of atherosclerosis, macrophages (namely the M1 phenotype) activate several mechanisms to ensure the initiation and progression of the disease. These immune cells are known to engulf oxidized LDL and to form foam cells. In addition, they can produce pro-inflammatory cytokines, activate the deregulation of extracellular matrix and secrete EVs. Moreover, M1 cells are characterized by defective efferocytosis and increased secondary necrosis. Taken together, these processes are thought to launch microcalcification formation. On the other hand, VSMCs can also change into osteoblast-like cells; thus promoting additional crystal deposition. It is worth noting that a thin fibrous cap is a major feature of an unstable rupture-prone lesion. **(B) Stable atherosclerotic lesion.** It is believed that the transition of VSMCs into osteoblast-like cells is induced by M2 macrophages to form macrocalcification deposits. In this context, M2 cells have been reported to generate calcification inhibitors, accumulate smaller lipid droplets, produce anti-inflammatory mediators, activate clearance of apoptotic debris and accelerate tissue repair via stimulating angiogenesis, chondrocyte formation and fibrosis. EVs: Extracellular vesicles, IL-1 β : Interleukin 1 β , TNF- α : Tumor necrosis factor α , VSMCs: Vascular smooth muscle cells.

Figure 1

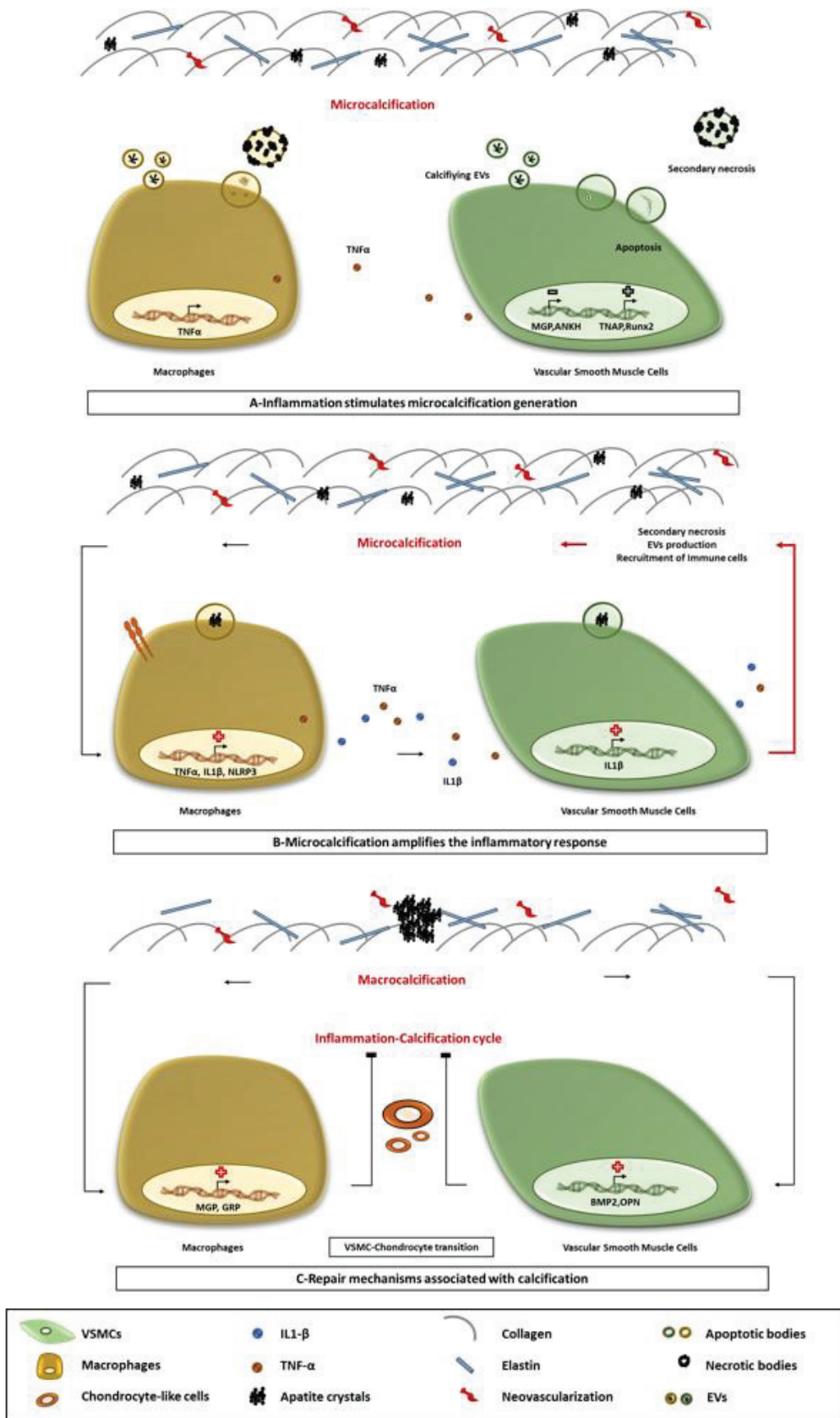
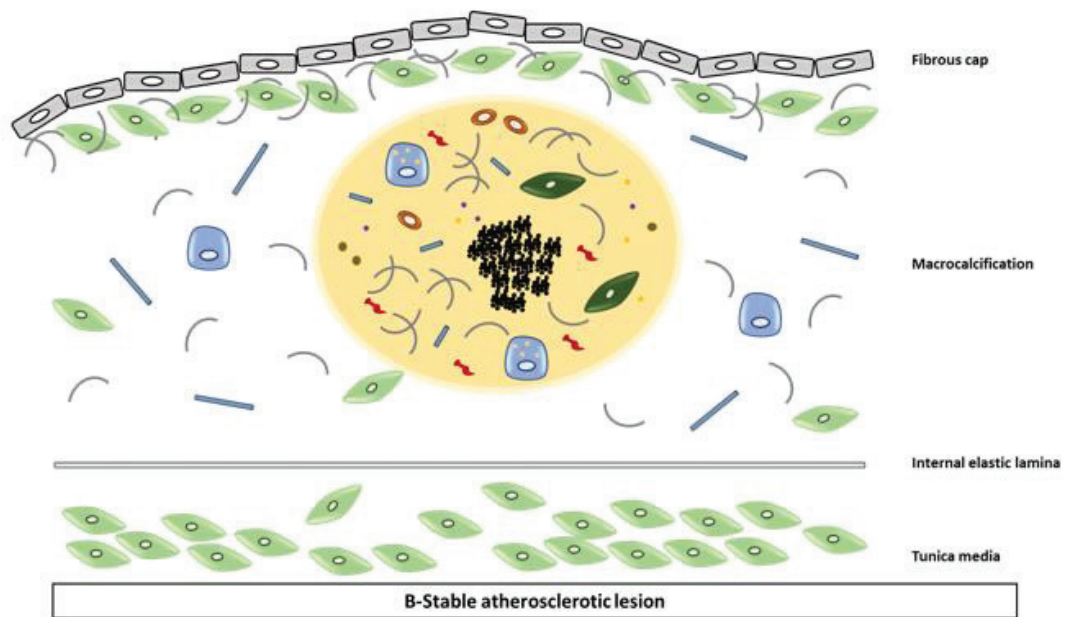
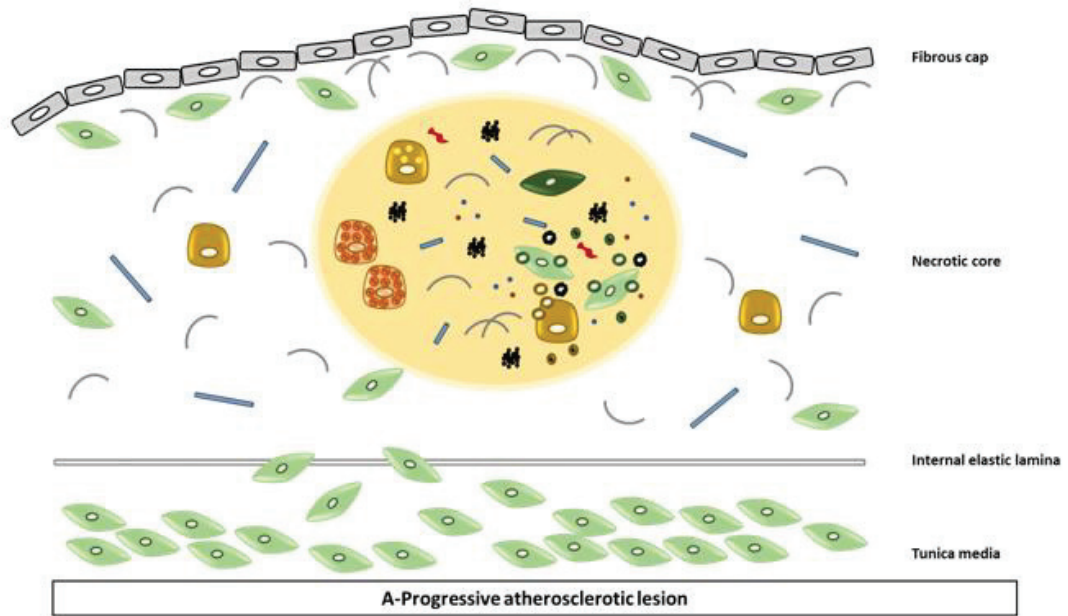


Figure 2



Endothelial cells	Macrophages M1	Collagen	Apatite crystals
VSMCs	Macrophages M2	Elastin	Apoptotic bodies
Osteoblast-like cells	Foam cells	Neovascularization	Necrotic bodies
Chondrocyte-like cells	Macrophages containing lipid droplets	TNF-α	EVS
IL1-β		Anti-inflammatory mediators	Calcification inhibitors

TNAP inhibition prevents plaque calcification and protects mice from atherosclerosis

Bessueille L^{1,*}, Kawtharany L^{1,*}, Quillard T², Goettsch C³, Briolay A¹, Taraconat N⁴, Balayssac S⁴, Gilard V⁴, Mebarek S¹, Peyruchaud O⁵, Duboeuf F⁵, Bouillot C⁶, Pinkerton A⁷, Mechtouff L^{8,9}, Buchet R¹, Hamade E¹⁰, Zibara K¹⁰, Fonta C¹¹, Canet-Soulas E⁹, Millan JL⁷, Magne D¹

*both authors contributed equally

¹ ICBMS UMR CNRS 5246, Université Claude Bernard Lyon 1, France.

² UMR1238 INSERM, Université de Nantes, CHU de Nantes, France.

³ Department of Internal Medicine I, Cardiology, Medical Faculty, RWTH Aachen University, Aachen, Germany

⁴ Laboratoire des IMRCP, Université de Toulouse, CNRS UMR 5623, Université Toulouse III – Paul Sabatier, France.

⁵ INSERM, Unit 1033, LYOS, Lyon, France.

⁶ CERMEP-Imaging Platform, Bron, France.

⁷ Sanford Burnham Prebys, La Jolla, CA 92037, United States of America.

⁸ Stroke Department, Hospices Civils de Lyon, France

⁹ Univ Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM, INRA, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

¹⁰ PRASE and Biology Department, Faculty of Sciences - I, Lebanese University, Beirut, Lebanon.

¹¹ Brain and Cognition Research Center CerCo, CNRS UMR5549, Université de Toulouse, France.

Short title: TNAP inhibition reduces atherosclerosis

Corresponding author: David Magne

Metabolism, Enzymes and Molecular Mechanisms, ICBMS UMR CNRS 5246 University Lyon 1; Batiment

Raulin 1^{er} étage, 43 bd du 11 novembre 1918 ; 69622 Villeurbanne cedex, France

Acknowledgements

This study was funded by European Research Area Network on Cardiovascular Diseases (ERA-CVD, Microexploration project 2018-2021) and by the “Fondation de France” (project 00086497). Part of the metabolomic studies were supported by the Association Hypophosphatasie Europe (contract 194679).

Abstract

Rationale: While the vascular calcium score predicts cardiovascular mortality, the local impact of calcification on atherosclerotic plaque progression remains controversial. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), the enzyme necessary for skeletal mineralization, is suspected to participate in vascular calcification. TNAP is expressed in atherosclerotic plaques, and is also produced in the liver and released in the circulation at levels that correlate with metabolic syndrome and cardiovascular mortality. In this context, we sought to investigate the effect of a recently developed TNAP inhibitor on atherosclerotic plaque calcification and progression.

Methods: plaque calcification was explored in ApoE-deficient mice fed a high fat diet from 10 weeks of age, with ^{18}F -NaF positron emission tomography (PET) and computed tomography (CT) *in vivo*, and with the calcium tracer osteosense *ex vivo*. TNAP levels were investigated in mice and in human carotid plaques. TNAP was inhibited in mice using SBI-425 (30 mg/kg/day) administered from 10 to 25 weeks of age, and in human vascular smooth muscle cell (VSMC) cultures with its parental compound MLS-0038949.

Results: In mouse aortas and human carotids, plaque calcifications consistently colocalized with TNAP. TNAP inhibition prevented calcification in human VSMCs and in mouse plaques, in association with decreased plaque inflammation and lipid accumulation, and reduced levels of serum cholesterol and triglycerides. Importantly, these beneficial effects of TNAP inhibition occurred without significantly impacting the skeleton or liver. Metabolomics analysis of liver extracts identified phosphocholine as a likely substrate of liver TNAP, whose reduced dephosphorylation upon TNAP inhibition may have reduced the release of cholesterol and triglycerides into the blood, and consequently inhibited plaque development.

Conclusion: the systemic inhibition of TNAP ameliorates atherosclerosis acting on both vascular and liver TNAP.

Keywords: Atherosclerosis, calcification, inflammation, TNAP, liver, NASH

Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) are responsible for 17.9 million deaths each year, which represents 31% of all deaths worldwide (<https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases>). Rupture of an atherosclerotic plaque is considered the primary reason for cardiovascular death, accounting for most myocardial infarction cases and about 20% of ischemic strokes ¹. Therefore, identifying a vulnerable plaque is an important goal in cardiovascular research. Acknowledged features of vulnerability include a large lipid and necrotic core, a thin fibrous cap and intraplaque hemorrhage ². In addition, recent data suggest that microcalcifications, characterized by a size less than 10 μm , and not macrocalcifications ³⁻⁵, negatively impact plaque stability. Clinically, microcalcifications can be imaged distinctly from macrocalcifications with ¹⁸F-NaF positron emission tomography (PET) ⁶, because fluoride ions can replace hydroxyl ions in newly formed apatite crystals, but not in more mature, inert macrocalcifications. To date, several *ex vivo* and *in vivo* studies have shown that ¹⁸F-NaF accumulates in plaques with hallmarks of vulnerability, predicting future events ⁷⁻⁹. Microcalcifications may destabilize plaques through pro-inflammatory and mechanical mechanisms. In human macrophage cultures, microcalcifications measuring from 1 μm to 15 μm induce the release of tumor necrosis factor (TNF)- α at levels inversely associated with crystal size ^{10,11}. Microcalcifications can also exert a harmful mechanical stress and favor plaque rupture, especially when they develop in the fibrous cap ¹²⁻¹⁴. Nonetheless, in the absence of calcification inhibitors that could be used *in vivo*, the real impact of microcalcifications on plaque progression remains purely speculative. In this regard, the recent development of an effective specific and *in vivo* usable inhibitor of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) should help fill this gap in knowledge ¹⁵.

TNAP, the enzyme necessary for physiologic bone and tooth mineralization ¹⁶, has indeed emerged as a likely suspect responsible for plaque calcification [reviewed in ¹⁷]. TNAP is normally expressed under the control of the transcription factor RUNX2 in hypertrophic chondrocytes and osteoblasts, where it hydrolyzes the constitutive mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate (PP_i), to allow progression mineralization onto the extracellular matrix ^{18,19}. Interestingly, in atherosclerotic Apolipoprotein (Apo)E-deficient mice, vascular smooth muscle cell (VSMCs) transdifferentiate into chondrocytes and express TNAP before calcification can be detected ²⁰⁻²². Moreover, VSMC-specific deletion of RUNX2 in these mice ²³, or in atherosclerotic mice deficient in low density lipoprotein receptor ²⁴, strongly reduces calcification, further suggesting that TNAP is involved. In humans, where plaque calcification does not seem to involve cartilage formation, and bone formation only in a minority of plaques

²⁵, TNAP is suspected to stimulate plaque formation from the circulation ^{26,27}. As its name indicates, TNAP is indeed relatively ubiquitous; in humans, while predominantly expressed in the skeleton and teeth during physiologic mineralization, it is also expressed in the liver and released into the blood in amounts increasing with cholestasis and more generally with the development of metabolic syndrome (MetS) ^{26,28-32}. Since genetic deficiency in PP_i generation resulting in reduced blood PP_i leads to vascular calcification ^{33,34}, it is suspected that increased serum TNAP in MetS exacerbates plaque calcification.

In the present study, we explored the involvement of TNAP in plaque calcification using ApoE-deficient mice, human carotid plaques and cultured human VSMCs. To take into account the ubiquitous nature of TNAP, we also analyzed the effects of its inhibition on the skeleton, kidneys and liver. We report that systemic TNAP inhibition ameliorates atherosclerosis, as evidenced by reduced plaque growth, accumulation of lipids, inflammation and calcification, and decreased blood triglyceride and cholesterol levels, without exerting significant toxicity on any tissue investigated.

Materials and methods

Animal experiments

The present project received authorization from the ethics committee of the French Ministry of Education, Research and Innovation (APAFIS#15387-2018060708052279). Four cohorts of mice were used in these studies (Supplemental Figs 2A and 3A). Cohorts 1 and 2 were devoted to the *in vivo* and *ex vivo* characterization of TNAP-associated plaque calcification. 6-week-old *ApoE*-deficient male mice (Charles River, Lyon, France) were received at the animal facility of the INSA (Lyon, France; Cetil n°C2EA-102), and placed in conventional cages with 5 mice per cage. Mice were maintained on a 12-hrs light-dark cycle (7:00 am-7:00 pm) and were supplied with food and water *ad libitum*. From 10 weeks of age, they were fed *ad libitum* with a high fat diet (HFD, D12108C, Research Diets, New Brunswick, USA) containing 40% fat (kcal) and 1.25% cholesterol (weight). In cohort 1, 8 mice were sacrificed every 2 weeks between weeks 17 to 31, after overnight fasting, for histological and molecular analyses. Total body weight was measured weekly after starting the HFD. The sacrifice was done by CO₂ inhalation after anesthesia with isoflurane and intracardiac blood puncture. Tissues were harvested as described below. The abdominal aorta was used for quantitative polymerase chain reaction (PCR) analyses. We used mice from cohort 2 to analyze aorta calcification with ¹⁸F-NaF μPET and μCT and to compare the *in vivo* data with the *ex vivo* results obtained in cohort 1. Cohorts 3 and 4 were used to determine *in vivo* and *ex vivo* the impact of TNAP inhibition on the vasculature, liver, bones and kidneys. According to the results obtained in cohorts 1 and 2, we administered the TNAP inhibitor SBI-425 (30 mg/kg/day, formulated as a food admixture in the HFD) in a preventive manner from 10 weeks of age³⁵. Treatment was stopped at 25 weeks or 31 weeks of age. Plaque calcification was analyzed at 25 weeks and possible side effects of TNAP inhibition were explored in mice aged 31 weeks. Mice in cohort 3 (2 groups of 13 mice) were used for *ex vivo* analysis, and mice in cohort 4 (2 groups of 12 mice) for *in vivo* imaging and *ex vivo* analyses.

In vivo imaging

Animals were transferred from the animal facility to the Cermep imaging platform (Lyon/Bron, France). Mice were placed into a chamber connected to an isoflurane anesthesia unit. Anesthesia was induced using an airflow rate of 0.8 L/min and 4% isoflurane, airflow rate was then maintained to 0.6 L/min with 2% isoflurane during the scans. After induction, mice were injected with 0.36 MBq/g of ¹⁸F-NaF in 0.1mL saline via tail vein (19 scans) or in retro-orbital venous sinus (16 scans) when the tail veins were not available. After injection, the animals were

placed in the prone position on the scanning bed. PET-CT images were obtained using a micro PET-CT scanner (Inveon PET-CT, Siemens, Germany). Mice were positioned into the CT system and imaged using the magnification low acquisition settings (acquisition parameters: attenuation mode; projection: 120 ; rotation: 200° ; estimated scan time: 492s ; binning 4x4; effective voxel size: 0.111 x 0.111 x 0.111 mm³; voltage: 80 kV; current: 500 μA; filter thickness: 0.5 mm; exposure: 200 ms). After CT acquisition, mice were moved into the center of the PET scanner (axial field of view: 127mm). PET acquisition started exactly one hour after ¹⁸F-NaF injection, for a total scan time of twenty minutes. Then, mice were allowed to recover into a lead shielded cage. Static images of the 20-min PET acquisitions were reconstructed with attenuation and scatter correction by 3D ordinary Poisson ordered subsets expectation maximization (OP-OSEM3D) with 4 iterations and a zoom factor of 2. The reconstructed volume was constituted of 159 slices of 128 × 128 matrix voxels, with voxel size 0.388 × 0.388 × 0.796 mm³. CT data were reconstructed using a Feldkamp algorithm with a down sample of 1 (Inveon Acquisition Workplace, Siemens). After reconstruction, the PET and CT data were coregistered. Images were analyzed using Inveon Research workplace (Siemens). The presence of atherosclerotic plaques was evaluated both in CT and PET images. Due to the higher resolution of the CT scan, regions-of-interest (ROI) of the aortic arch were drawn on CT images. Only voxels above the threshold of 390 Hounsfield Unit (calcified structure) were considered. The ROIs were exported onto the coregistered PET images in order to measure ¹⁸F-NaF uptake. Standardized uptake value ratio (SUVR) were calculated using the whole body SUV as reference.

Tissue harvest and processing

After euthanasia, the heart and vasculature were perfused with sterile NaCl 0.9%. The aortic root and the aortic arch, with the major arteries that stem from them (brachiocephalic, left common carotid and left subclavian), were dissected under a microscope and frozen in optimal cutting temperature medium (OCT, Thermo Scientific) and stored at -80 °C before serial cryo-sectioning. Abdominal aortas were dissected, rinsed once with sterile phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.8, and frozen until RNA extraction. Cryostat sections (5-μm thick) were cut at -21 °C using a Leica CM3050 S cryostat (Leica), mounted on glass slides (SuperFrost Plus Gold glass slides, Thermo scientific) and stored at -80°C until use. Four sections of 5-μm thickness were harvested per slide, yielding 25 to 45 slides per mouse. Prior to analysis, frozen tissue sections were air-dried at room temperature for 10 min and eight consecutive sections were taken from each mouse at 15-μm intervals. Calcification was imaged by near-infrared fluorescence (NIRF) with the calcium tracer osteosense (OS) (PerkinElmer, ex/em 650/680 nm) as previously described³⁶. Briefly, frozen sections were treated overnight with OS 680 (1:100) before NIRF imaging.

Quantification was performed by computer image analysis using Image J software (NIH, Bethesda, MD) by averaging of measurements from 2 sections of 15 μm apart. Alkaline phosphatase activity was stained in serial sections using nitro blue tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) solution³⁷.

To perform CD68 immunohistochemical staining to detect macrophages, serial frozen sections of aortic arch were fixed in acetone ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 10 min and were air-dried afterwards for 10 min. Endogenous peroxidase activity was neutralized with 0.3% H_2O_2 for 10 min followed by 3 washing steps of 5 min each using TBS pH 7.4 containing 0.025% Triton-X100. Sections were incubated with Tris buffered saline (TBS) containing 5% normal goat serum (Abcam) and 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h to reduce non-specific background staining. Sections were subsequently incubated overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ with anti-CD68 antibody (Abcam ab125212) diluted in TBS containing 1% BSA. Horseradish peroxidase-conjugated polyclonal anti-rabbit secondary antibody (Abcam) was applied for 1 h and then revealed with a DAB staining kit (Abcam). Preparations were counterstained with hematoxylin-eosin (Mayer's hematoxylin solution, Sigma). Negative control sections were analyzed using a similar procedure excluding the primary antibody. Images of the sections were captured with an Eclipse TI-E microscope fitted with a DSiQ2 digital camera combined with Nikon's NIS Elements imaging software (Nikon Instruments Inc.). At least 2 sections per mouse were examined for CD68 immunostaining.

For oil Red O staining of neutral lipids, sections were rehydrated in PBS for 5 min, fixed with 10% neutral buffered formalin for 5 min, extensively washed with water, and then treated with propylene glycol for 2 min. The sections were then stained with oil red O solution (0.5% in propylene glycol) for 15 min at 60°C and extensively washed with water. After the oil red O staining procedure, the sections were counterstained with hematoxylin-eosin staining (Mayer's hematoxylin solution, Sigma). Images were captured with an Eclipse TI-E microscope and digital camera (Nikon), combined with Nikon's NIS Elements imaging software. To visualize cartilage glycosaminoglycans, sections were stained with Alcian blue 8GX (Sigma) at pH 2.5 (1% in 3% acetic acid).

Blood biochemistry

Blood was collected from mice by cardiac puncture under anesthesia with isoflurane. Serum was obtained through centrifugation of the blood for 15 min at 1,500 g at 4°C , frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before analysis. Concentration of total cholesterol and triglycerides were measured using a colorimetric (MAK043, Sigma) and a fluorimetric assay (MAK266, Sigma), respectively. Total bile acids were assayed with a commercial

enzyme-based colorimetric kit (Abcam Ab239702). Serum IL-6 and haptoglobin levels were determined using the commercially available ELISA kits (Fischer Scientific 10110623 and Abcam 157714, respectively). The alkaline phosphatase activity assay was adapted from a previously published protocol and performed in a 96-well plate³⁸. Briefly, sera were mixed with a concentrated buffer at a ratio of 2.85:1 (*vol/vol*) in order to get final concentrations of 0.56 M 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer pH 10.5, 1 mM MgCl₂ and 10 mM *p*-nitrophenylphosphate. Absorbance was acquired for 5 min at 405 nm (Tecan plate reader). The slope was calculated to determine TNAP activity levels in each sample and normalized to protein amounts measured with the BCA protein assay (Pierce).

Bone parameters

3D microarchitecture of the distal metaphyseal femur and cortical midshaft were carried out using a Skyscan 1176 micro-CT scanner (Skyscan Inc.). The X-ray excitation voltage was set to 50 kV with a current of 500 mA. A 0.5 mm aluminum filter was used to reduce beam-hardening artifacts. Samples were scanned in 70% ethanol with a fixed voxel size of 9.08 μm . Section images were reconstructed with NRecon software (version 1.6.1.8, Skyscan). The region of interest (ROI) to delineate trabecular bone was drawn manually away from the endocortical surface, starting at 0.5 mm underneath the growth plate and ending at 1.5 mm. For cortical analysis, 0.5 mm on either side of the femur midshaft were reconstructed. The global threshold was set at 0.394 g HA/cm³. Three-dimensional modeling and analysis of bone volume mineral density (BMD), tissue volume mineral density (TMD), bone volume to tissue volume ratio (bone volume/tissue volume, BV/TV) were obtained with the CTAn (version 1.9) and CTVol (version 2.0) software.

Liver biochemistry

For the determination of cholesterol, triglycerides, and total bile acids in the liver, 40-mg pieces of liver were homogenized in 1 mL of 5% NP40 solution in a dounce homogenizer. The hydrophobic components were extracted twice at 80°C for 5 minutes. The samples were centrifuged and the supernatants were assayed for cholesterol, triglycerides and bile acids with the same kits used for blood. In order to quantify hydroxyproline, 100-mg pieces of liver were homogenized in 1 mL of pure water in a dounce homogenizer and a perchlorate-free kit from Sigma was used (MAK357).

Metabolomics analysis

Liver and kidney extraction and NMR measurement: The frozen tissues were weighed and then extracted according to Beckonert's procedure³⁹ using the methanol-chloroform-water system [2:2:1.425 (v/v/v)], and including absorbance measurement using the Bradford reagent with BSA as standard. The upper methanol/water phase was collected, dried, lyophilized and stored at -80°C. Deuterated phosphate buffer at pH = 7.4 (200 mM) was added to the dried aqueous extract with TSP (sodium 2,2,3,3-tetradeutero-3-trimethylsilylpropionate) (Sigma-Aldrich) as internal chemical shift and quantification reference. ¹H NMR spectra were recorded at 298 K on a Bruker Avance spectrometer 500 equipped with a 5-mm TCI cryoprobe. The 1D pulse sequence (relaxation delay-pulse-acquisition) with pre-saturation for water (HOD) signal suppression was used. Acquisition parameters were as follows: relaxation delay 5.64 s, 30° pulse (4.5 μs) and acquisition time of 4.36 s. The spectral width of 15 ppm was used and 256 scans were collected. With this repetition time of 10 s, the ¹H resonances were fully relaxed. Data were processed using Bruker TopSpin software 3.2 with one level zero-filling and apodization (exponential, lb = 0.3 Hz) before Fourier transform, then phase correction, simple baseline correction and calibration ($\delta_{\text{TSP}} = 0$ ppm) were applied.

Chemometric analysis of NMR data: Data NMR matrices were obtained using facilities included in KnowItAll® (Wiley Science Solutions) and NMRProcFlow® (<https://nmrprocflow.org/>)⁴⁰ software. First, the bucket list was obtained by the bin area method using the intelligent variable size bucketing tool included in the KnowItAll® package according to NMR signals assignment. Second, NMRProcFlow® pipeline was used for local baseline correction of spectra, alignment of NMR signals and integration of NMR area by that bucket list. Then integrated regions were normalized by dividing their areas by that of the internal standard TSP and by the weight of tissue. Statistical analysis, supervised Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) and the nonparametric Wilcoxon test were carried out using the SIMCA-P+ 13.0.3 (Sartorius, Aubagne, France) and Matlab® (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) software.

¹H NMR absolute quantification of metabolites: Metabolites were assigned with an in-house metabolite database at pH = 7.4. A total of 34 and 39 metabolites were identified; 30 and 35 could be quantified for liver and kidney respectively. Metabolites concentrations (ng/mg tissue for liver and μg/mg protein for kidney) were given by $m_x = A_x/A_{\text{TSP}} \cdot 9/N_x \cdot 112 \cdot M_x/m_L$ with A_x and A_{TSP} being the areas of the signals of metabolite X and TSP, 9 and N_x the number of protons of TSP and metabolite X evoking the signals, 112 the number of nmol of TSP in the solution analyzed, M_x the molecular weight of metabolite X and m the weight (mg) of tissue (liver) or proteins (kidney) analyzed.

Human samples

Analysis in human samples has been performed on healthy and diseased carotid arteries. Carotid plaques [n=101 calcified, and 14 non-calcified from the ECLAGEN biocollection ²⁵] were removed by endarterectomy at the bifurcation from within the lumen as a single specimen. All samples were 1-2 cm long. For histology, we analyzed sections of the lesion core present in each arterial sample. Sample collection and handling were performed in accordance with our institutional medical ethics committee (research protocol#PFS09-014, n°DC-2008-402), and all patients participating in the study provided written informed consent. In the case of organ donors (healthy arteries), the absence of patient opposition to organ donation and an informed and signed consent was required from the patient's family. The arterial samples were fixed in 10% formalin for 48 h, decalcified in 4.13% EDTA-0.2% paraformaldehyde pH 7.4 over 4 days in KOS sw10 (Milestone), and embedded in paraffin. Following heat-induced epitope retrieval in EDTA pH 9, serial sections (4- μ m thick) were stained with TNAP (Abcam), and Runx2 (Abcam) antibodies. Imaging of the sections was obtained with the NanoZoomer device (Hamamatsu Photonics).

Human VSMC cultures

Human coronary artery VSMCs (PromoCell) were grown in SMC growth medium 2 (SMC-GM2, PromoCell) supplemented with epidermal growth factor (0.5 ng/mL), insulin (5 μ g/mL), basic fibroblast growth factor- β (2 ng/mL), and fetal bovine serum (5%) at 37 °C in humidified 5% CO₂. Cells were used between passages 3 and 9. Cells from 4-5 independent donors were used. VSMCs were cultured for up to 21 days in the presence of either control medium (DMEM, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin) or osteogenic medium (consisting of control medium supplemented with 10 nM dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate, and 100 μ M L-ascorbate phosphate). The media were changed 3 times per week. Mycoplasma contamination test was routinely performed (once a month). TNAP activity was inhibited by the TNAP inhibitor MLS-0038949 (Merck, CAS 496014-13-2), the parent compound of SBI-425 ⁴¹. TNAP activity was determined by the Alkaline Phosphatase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, San Francisco, USA) according to the manufacturer's instructions. TNAP activity was normalized to the protein amount. To visualize calcification, cells were washed and fixed with 4% paraformaldehyde for 10-15 min at room temperature. The mineralized matrix was visualized by 2% (w/v) Alizarin Red staining (Sigma Aldrich).

Quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis

Mouse tissues: total RNAs were extracted from grinded abdominal aorta and liver with the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's protocol. The quantity and quality of RNA measuring absorbance at 260 and 280 nm with a NanoDrop. RNA (1 µg) was retro-transcribed into cDNA with Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies). PCR analysis was conducted using SYBR green Supermix (Biorad) on the iCycler Real-Time Detection system (Biorad). Fold change in mRNA expression was calculated using the $2^{-\Delta C_t}$ method by the CFX Manager software (Biorad). Data were normalized by 3 housekeeping genes (HPRT, Actin and Rpl13a) levels. Primers and PCR conditions are given in Table I in the data supplement. The obtained products were checked by sequencing.

Human VSMCs: total RNA was isolated using TriZol (Life Technologies) and mRNA levels were determined by TaqMan-based real-time PCR (Life Technologies). The following TaqMan probes were used: HS01047978_m1 (human Runx2), HS99999902_m1 (human Rplp0). The expression levels were normalized to Rplp0. Results were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method, and presented as fold increase relative to control.

***In vitro* dephosphorylation of phosphocholine and phosphoethanolamine by TNAP**

25 µM of phosphocholine or phosphoethanolamine were incubated at 37°C with recombinant human TNAP (Biolegend 794504) or mouse TNAP (Biolegend 787804) in a Tris-HCl saline buffer pH 7.4 containing 1 mM MgCl₂. After different time points, P_i release was determined using Malachite Green reagent.

Statistics

Data are expressed as the mean ± SEM or SD, as indicated in the Figure legends. Statistical analyses were performed with Past 3.20 software. Data were tested on normality and on equal variances with the Shapiro-Wilk test and Levene test respectively. Then, data were analyzed on appropriate parametric or nonparametric test, as indicated in the Figure legends. P<0.05 was considered significant.

Results

TNAP is located in close proximity with calcifications in human carotid plaques, and its inhibition in cultured human VSMCs prevents calcification

Plaque calcification proceeds through distinct mechanisms in mice and humans. While it relies on endochondral ossification in ApoE-deficient mice ^{20,21}, in humans it often occurs through intramembranous ossification in peripheral arteries and more rarely in carotids or coronaries ²⁵. To avoid obtaining results and drawing conclusions that may only be true in mice but not in humans, we first explored whether carotid plaque calcification in humans may rely on TNAP. To this purpose, we used a biocollection of human carotid plaques in which the calcification morphology (microcalcifications, calcium nodules, sheet-like calcifications and osteoid metaplasia) has been characterized in details ²⁵. In these lesions and independently of the calcification type, TNAP was consistently located at the proximal periphery of calcifications (Fig. 1). Interestingly, even when signs of bone-like structures or ossification were not observed, TNAP was often coexpressed with RUNX2, the master transcription factor governing osteoblast and hypertrophic chondrocyte differentiation. These data suggested that even in human plaques that did not show features of ossification or presence of bone-like cells, calcification relied on TNAP expressed under the control of RUNX2, presumably in trans-differentiated cells. Moreover, TNAP was probably active before calcification formed, because we observed RUNX2 and TNAP coexpression in plaque regions with no calcifications (Fig. 1), and also in carotids with no plaques (Suppl. Fig. 1A). Calcification relied at least in part on TNAP in these human plaques, because when cultured human VSMCs were stimulated by an osteogenic medium (OM) to express RUNX2 (Suppl. Fig. 1B,C), TNAP inhibition totally prevented calcification (Suppl. Fig. 1D-F). These *ex vivo* and *in vitro* data in humans encouraged us to determine the *in vivo* effects of TNAP inhibition in atherosclerotic mice.

TNAP is expressed in close proximity with calcifications in mouse plaques and its inhibition prevents plaque calcification and decreases plaque inflammation

In order to determine when TNAP inhibition should be initiated and stopped in *ApoE*-deficient mice, we thoroughly characterized the time-course of atherosclerotic plaque development in animals sacrificed every two weeks from 17 to 31 weeks of age in cohort 1, devoted to *ex vivo* analyses, and in animals imaged *in vivo* with ¹⁸F-NaF μ PET/ μ CT at 19, 25, 31 and 34 weeks in cohort 2, (Suppl Fig. 2A). Consistent with the pioneering studies from the group of Elena Aikawa ²², osteosense (OS)-based imaging detected calcifications ($\approx 10 \mu\text{m}$ in size) from

19-21 weeks of age (Fig. 2A). Early calcifications were first spotted in the aortic arch (Fig. 2A,B), and were followed by calcifications in other arteries, such as the left common carotid (Fig. 2C). Calcifications initially developed in or near necrotic and lipid cores, after which they progressed into cartilaginous metaplasia (Fig. 2D-F) ²⁰. In some mice, they eventually merged to occupy the whole aortic arch, which was then totally devoid of necrotic cells and lipids (Fig. 2D-F). The number of calcifications logically increased from 17 to 23 weeks; it stopped increasing or even decreased at 25 weeks because of the merging of calcifications in the aortic arch, and increased again at 27 weeks when calcifications began to form in other arteries (Fig. 2G). The total surface of calcifications determined *ex vivo* by histology (Fig. 2H) and the total volume of calcifications determined *in vivo* by μ CT (Fig. 2I, Suppl Fig. 2B) increased similarly and relatively regularly. In contrast, the calcification activity measured *in vivo* with ¹⁸F-NaF μ PET revealed that calcification slowed down at 31 weeks of age (Fig. 2J, Suppl Fig. 2C). This slowdown was concomitant with the stagnation of chondrocyte transcript levels between 27 and 31 weeks, after these transcripts had increased in two waves, the first at 19 weeks, and the second at 27 weeks (Fig. 2K, Suppl Fig. 2D). The transcript levels of *Alpl* encoding TNAP also increased with the same two waves, and were highly associated with the transcripts encoding of *Runx2* (Fig. 2L), suggesting that TNAP was almost exclusively produced by VSMCs trans-differentiated into hypertrophic chondrocytes. Finally, TNAP was apparently locally involved in plaque calcification since TNAP activity was detected in plaques before calcification could be detected, and because when calcifications were present, they were consistently observed in close proximity with TNAP activity (Fig. 2M) ²². Collectively, these *ex vivo* data suggested that calcification was not linear but developed within two waves: the first one at 19 weeks, likely associated with aortic arch calcification, and a second one at 27 weeks, associated with the onset of calcification in other arteries. In this context, we chose to initiate TNAP inhibition from 10 weeks of age in a preventive manner, by administration of 30 mg/kg/day of SBI-425 admixed in the HFD ³⁵, and to analyze the impact of TNAP inhibition at 25 weeks, after the first wave of calcification (Suppl. Fig. 3A).

TNAP inhibition was apparently well-tolerated, with no effect on mortality, body weight, or bone architecture even when the treatment was prolonged for 21 weeks (Suppl. Fig. 3B,C). As hypothesized, TNAP inhibition prevented plaque calcification, with 0 out of 12 mice having calcifications in the SBI-425 group, against 6 out of 11 in the control group as determined *in vivo* with ¹⁸F-NaF μ PET (Fig. 3A) and μ CT (Fig. 3B). By histology, which proved more sensitive in detecting early calcifications than ¹⁸F-NaF μ PET and μ CT (Fig. 2), we observed that while 13 out of 13 mice developed calcifications in the control group, only 9 out of 13 mice formed

calcifications in the SBI-425 group (Fig. 3C). Moreover, even when SBI-425-treated mice developed calcifications, the number of calcifications per mouse was lower. Upon SBI-425 treatment, plaques were smaller (Fig. 3D) and contained less lipids (Fig. 3E). Prevention of calcification by SBI-425 administration was apparently not accompanied by reduced levels of chondrocyte markers (*Sox9*, *Acan*, *Runx2* or *Alpl*, Fig. 3F). In contrast, SBI-425 significantly decreased the levels of the inflammatory markers *Opn*, *Cd68*, *Rankl*, *Il8* and *Il6* levels (Fig. 3F) and reduced serum IL-6 levels, although not significantly (Fig. 3G). Prevention of new calcifications and decreased inflammation were likely two intimately associated effects, because in both treated and untreated mice, small calcifications, but not advanced macrocalcifications, were consistently observed in plaque regions enriched in CD68-positive macrophages (Fig. 3H). Collectively, these data suggested that TNAP inhibition exerted beneficial effects on plaque calcification and inflammation. We then wondered whether these local effects in plaques impacted the levels of lipids in the circulation. Unexpectedly, we found that TNAP inhibition significantly decreased the serum levels of cholesterol and triglycerides (TGs) (Fig. 3G). This suggested that SBI-425 might also have impacted plaque development by inhibiting liver TNAP.

TNAP expression increases in the liver of *ApoE*-deficient mice during non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

In order to better understand the functions of TNAP in the liver, we first characterized how liver TNAP was regulated during the development of NASH induced by HFD in *ApoE*-deficient mice⁴². Fasting serum cholesterol levels in *ApoE*-deficient mice were about 10-times higher than in wildtype mice given the same HFD (data not shown), and relatively stable from 17 to 31 weeks, with the exception of a decrease at 23 weeks (Fig. 4A), concomitant with the decrease in inflammation and cartilage formation in aortic plaques (Fig. 2K,L and Supplemental Fig 2D,E). Liver cholesterol levels increased from 17 to 25 weeks, to then decrease from 27 to 31 weeks (Fig. 4B). This late decrease in liver cholesterol content was correlated with the accumulation of cholesterol's degradation products, bile acids, indicative of cholestasis (Fig. 4C). Fasting serum and liver TGs evolved similarly, with two troughs at 19 and 27 weeks separated by about a month of higher serum and liver levels around 23 weeks (Fig. 4D,E). Liver levels of inflammatory transcripts (*Ly6g*, *Tnfa*, *Il1b*, *Hb*) and serum levels of haptoglobin suggested two peaks of inflammation at 19 and 27 weeks (Fig. 4F,G)]. These two inflammatory waves seemed associated with increases in blood glucose levels (Fig. 4H). TNAP expression in the liver has recently been reported to occur in association with liver fibrosis in mice fed a HFD⁴³. We confirmed that *Alpl* was overexpressed with the fibrosis markers *Tgfb1*, and *Colla1*, and concomitantly with rises of liver TGs

and cholesterol, and between the two inflammation waves (Fig. 4I). Liver TNAP was probably active locally because serum TNAP activity was not significantly increased (Fig. 4J).

Taking into account the time-course changes in the liver, the blood and the aorta, we drew a hypothetical model linking liver metabolism to plaque development (Fig. 5). In this model, liver inflammation is associated with increased fasting cholesterolemia and glycaemia which enhances plaque inflammation, chondrogenesis and calcification⁴⁴⁻⁴⁷. Plaque inflammation indeed appears to drive plaque calcification in *ApoE*-deficient mice^{22,48,49}. We moreover observed that in the aorta, the waves of chondrogenesis and calcification were associated with similar waves of inflammatory markers (Suppl. Fig. 2E). Furthermore, calcification activity (but not calcium volume) was positively associated with both inflammatory and chondrocyte markers (Suppl. Fig. 2F). Then, after establishing liver TNAP expression and liver disease in relation with plaque development, we investigated whether SBI-425 administration impacted liver inflammation, steatosis and/or fibrosis, to explain how it might have decreased serum lipids and impaired atherosclerotic plaque development.

Liver TNAP may impact serum lipid levels by participating in liver phosphatidylcholine metabolism

Since TNAP-deficient mice were recently reported to develop liver steatosis when fed a HFD⁵⁰, we suspected that SBI-425 decreased serum TGs by sequestering them in the liver. This however proved irrelevant because liver TG content was not increased by TNAP inhibition (Fig. 6A), nor were the levels of transcripts associated with fatty acid synthesis (*Srebp1c*, *Fas*) changed (Fig. 6B). TNAP inhibition neither exacerbated liver inflammation, as demonstrated by unchanged levels of *Ly6g*, *Tnfa*, *Il1b*, or *Hp* transcripts (Fig. 6B), nor changed serum haptoglobin levels (Fig. 6C). SBI-425 treatment did not modulate fasting glycemia (Fig. 6D), nor exacerbated liver fibrosis, as indicated by unchanged hydroxyproline levels (Fig. 6E). Finally, TNAP inhibition did not seem to impact cholesterol and bile acid metabolism, because SBI-425 did not change liver cholesterol levels (Fig. 6F), transcript levels of *Scarb1*, *Hmgcr*, *Abcg8*, *Cyp7a1* or *Cyp7b1* (Fig. 6G), or liver and serum bile acids levels (Fig. 6H,I).

To identify unsuspected mechanisms explaining how TNAP inhibition might have decreased serum lipids (Fig. 3I,J), we used a metabolomics approach to determine metabolites in the liver and kidneys whose levels were significantly impacted by SBI-425 administration. Multivariate statistical analysis on metabolomics data (PLS-DA) did not evidence a significant impact of TNAP inhibition on liver or kidney metabolism (Suppl. Fig. 4). Nevertheless, we observed an almost significant decrease in liver phosphocholine levels (Fig. 6J), and an almost

significant increase in kidney phosphocholine levels (Fig. 6K). Extracellular phosphocholine dephosphorylation in the liver is necessary to allow choline uptake in hepatocytes⁵¹, intracellular reformation of phosphocholine, and generation of phosphatidylcholine, which is required for VLDL production and release⁵². Choline-deficient diets or genetic deficiency in liver phosphatidylcholine production result in liver steatosis, reduced VLDL levels and impaired atherosclerosis in *ApoE*-deficient mice^{53,54}. We observed that while liver and kidney phosphocholine levels were positively correlated in control animals, they were negatively associated in mice treated with SBI-425 (Fig. 6L), suggesting that choline that could not enter into the liver was taken up by other tissues including the kidney. To our knowledge, the phosphatase that dephosphorylates extracellular phosphocholine in the liver and allows the uptake of choline in hepatocytes is unknown. In our *in vitro* experiments, mouse and human TNAPs were equally potent in dephosphorylating phosphocholine (Fig. 6M), suggesting that TNAP is that phosphatase. This hypothesis appears strengthened by the fact that liver phosphocholine levels were negatively associated with liver levels of TGs and cholesterol (Fig. 6N). Finally, if extracellular choline is the main source of phosphatidylcholine in hepatocytes, extracellular phosphoethanolamine is also used to a lesser extent to generate phosphatidylcholine intracellularly⁵². The phosphatase responsible for phosphoethanolamine dephosphorylation and ethanolamine uptake in hepatocytes is also unknown, and again could be TNAP. Indeed, mouse and human TNAPs were both able to dephosphorylate phosphoethanolamine (Fig. 6M).

Discussion

The current paradigm indicates that microcalcifications that form in atherosclerotic lesions, destabilize plaques by exerting mechanical and pro-inflammatory stresses^{4,7-9,55}. In the last two decades, TNAP has emerged as a likely candidate responsible for the initiation of plaque calcification [reviewed in¹⁷]. We presently observed that TNAP was already expressed in human carotid arteries devoid of atherosclerotic lesions, and that in carotid plaques, calcifications were consistently associated with TNAP expression. TNAP was also expressed before calcification could be observed in mouse atherosclerotic plaques, and when calcifications were present, they colocalized with TNAP activity. In both species, TNAP appeared to be mainly expressed in RUNX2-expressing cells. In mouse aortas, these cells were likely VSMC-derived hypertrophic chondrocytes²⁰⁻²². In human carotids, they were probably VSMCs partly but not fully transdifferentiated into osteochondrocyte-like cells, because ossification only occurs in a minority of plaques²⁵. Nevertheless, cells from both species probably used TNAP to induce plaque calcification in the human and mouse plaques we analyzed. TNAP inhibition prevented calcification in human VSMCs transdifferentiated into osteochondrocyte-like cells *in vitro*, and in ApoE-deficient mice *in vivo*. We may therefore conclude that TNAP is not only required for the physiological mineralization of bones and teeth⁵⁶, but that it is also responsible for the calcification of atherosclerotic plaques. If plaque calcification was not totally prevented in all mice, the number of calcifications was significantly reduced, which is thought to be associated with increased plaque stability [reviewed in⁵⁷]. Our histological data suggest that TNAP is involved locally, and the fact that in mice, blood TNAP activity was not at all associated with waves of aortic calcification, suggest that TNAP does not induce calcification from the circulation. This would mean that the association between serum TNAP activity and the cardiovascular mortality risk²⁶⁻³², does not rely on enhanced plaque calcification. The conclusion that circulating TNAP may not participate in plaque calcification is further supported by the observation that the very high blood TNAP activity resulting from administration for 8 months of recombinant TNAP in a patient with TNAP deficiency, did not increase the vascular calcium score⁵⁸.

In addition to preventing plaque calcification, TNAP inhibition also reduced plaque inflammation and size. Since microcalcifications are proinflammatory^{4,10,11}, prevention of plaque calcification by TNAP inhibition may be the cause of reduced plaque inflammation. However, we believe that TNAP inhibition also decreased plaque inflammation by reducing the levels of serum lipids, and impairing the entire development of atherosclerotic plaques. Plaque inflammation indeed appears to drive plaque calcification in *ApoE*-deficient mice^{22,48,49}, as well

as mineralization in cultured human VSMCs ³⁷. In contrast, while the smallest calcifications could be proinflammatory, they may rapidly grow and become less or not proinflammatory. We indeed report that the calcification activity in the aorta measured with ¹⁸F-NaF μ PET, but not the calcium volume measured with μ CT, positively correlated with the aortic levels of inflammation markers and chondrocyte markers. In addition, macrophages were more abundant in plaque regions with no or with small calcifications, than in regions with advanced calcifications [our results and ²²], in agreement with a recent study on human carotids ⁵⁹. Finally, when the whole aortic arch was calcified, it was mostly devoid of inflammatory cells, necrotic and lipid cores. These murine observations confirm a recent clinical report showing that, when considered as a percentage of the total plaque volume, increasing plaque calcification is a marker of plaque stability and reduced cardiovascular risk at both a lesion and patient level ⁶⁰. Collectively, these data suggest that inflammation is the chicken, and calcifications are the eggs ⁶¹⁻⁶⁴, and that SBI-425 decreased plaque inflammation by inhibiting liver TNAP and decreasing dyslipidemia.

TNAP activity is weak in the mouse liver ⁶⁵, but is increased during liver fibrosis ⁴³. TNAP's hepatic functions are poorly understood and may include regulation of bile excretion ⁶⁶, and/or prevention of pathological liver inflammation, fibrosis and steatosis ^{43,50}. The group of Poelstra recently reported that in mice fed a HFD, the increase in TNAP expression during liver fibrosis may be associated with increased dephosphorylation and detoxification of lipopolysaccharide (LPS) by TNAP ⁴³. Postprandial LPS absorption is indeed increased after high fat meals and its dephosphorylation in the intestinal lumen by intestinal alkaline phosphatase (IAP) reduces metabolic endotoxemia and metabolic syndrome in mice ⁶⁷. Liver TNAP may therefore accomplish the same function as IAP, but after LPS absorption. This TNAP function was however probably absent in our mice, or at least not responsible for reduced blood lipidemia upon TNAP inhibition. If we also observed that TNAP expression probably increased during the phase of liver fibrosis, TNAP inhibition did not increase serum LPS (data not shown) nor exacerbated liver inflammation. Moreover, increased liver inflammation would be expected to increase, not decrease, blood cholesterol and atherosclerosis ^{44,68}.

Despite thorough analysis, we could not detect any significant effect of SBI-425 on liver, including inflammation, steatosis, fibrosis or cholestasis. In a way, this is reassuring by suggesting that SBI-425 did not worsen steatohepatitis. On the other hand, the subtle effects exerted by SBI-425 on the liver incite us to propose a hypothetical mechanism. Among the many measurements we made in the liver, only the levels of phosphocholine

showed variations close to significance. Interestingly, TNAP could be the yet unknown phosphatase that dephosphorylates phosphocholine in the liver and allows its uptake in liver cells ⁵¹. This hypothesis is appealing because choline deficiency or genetic deficiency in liver phosphatidylcholine production reduces blood cholesterol levels and impairs atherosclerosis in *ApoE*-deficient mice ⁵²⁻⁵⁴. Moreover, while in absence of extracellular choline, extracellular ethanolamine can be used to generate phosphatidylcholine in the liver ⁵², TNAP could also be the phosphatase that dephosphorylate extracellular phosphoethanolamine and allows its uptake. This would help explain why individuals with genetic TNAP deficiency have increased serum and urine phosphoethanolamine levels ⁵⁶. We report that mouse and human TNAP were equally able to dephosphorylate phosphocholine and phosphoethanolamine *in vitro*, and that *in vivo*, TNAP inhibition decreased the intracellular levels phosphocholine in the liver, what would be expected if extracellular phosphocholine dephosphorylation was inhibited. There is nevertheless a lot of work remaining to be done to determine whether TNAP really exerts these functions *in vivo*, and whether they are responsible for the effects of SBI-425 on blood cholesterol and atherosclerosis. Moreover, an open question is why TNAP inhibition with SBI-425 did not exacerbate liver steatosis, since choline-deficient diets ⁵³, or TNAP deficiency ⁵⁰, induce liver steatosis. Being a phosphatase with broad substrate specificity, TNAP may exert other functions in the liver acting on other phosphorylated molecules. Since increased serum TNAP activity is generally indicative of cholestasis, and since TNAP may participate in the arrest of bile excretion ⁶⁶, the hypothesis that TNAP inhibition enhances cholesterol excretion through bile acids, and in this way decreases liver lipid levels, is worth exploring.

Conclusion

In the present article, we report that inhibiting TNAP with SBI-425 ameliorated atherosclerosis in mice, with reduced plaque size, inflammation and calcification. Our data suggest that SBI-425 probably acted on the one hand by inhibiting TNAP in plaques and preventing calcification, and on the other hand by inhibiting liver TNAP and reducing blood cholesterol. Whether TNAP might represent a promising therapeutic target in humans can still be debated. In our mouse experiments, administration of SBI-425 for several months did not significantly change bone architectural parameters, liver and kidney metabolism, systemic inflammation, or body weight. We are thus really looking forward to knowing the results of the first clinical trials using TNAP inhibitors.

Disclosures

JLM and AP are co-inventors on a patent covering SBI-425 (PCT WO 2013126608). Other authors declare no competing financial or non-financial interests.

References

- 1 Ornello, R. *et al.* Distribution and Temporal Trends From 1993 to 2015 of Ischemic Stroke Subtypes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke* **49**, 814-819, doi:10.1161/STROKEAHA.117.020031 (2018).
- 2 Silvestre-Roig, C. *et al.* Atherosclerotic plaque destabilization: mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circ Res* **114**, 214-226, doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302355 (2014).
- 3 Karlöf, E. *et al.* Correlation of computed tomography with carotid plaque transcriptomes associates calcification with lesion-stabilization. *Atherosclerosis* **288**, 175-185, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2019.05.005 (2019).
- 4 Shioi, A. & Ikari, Y. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression. *J Atheroscler Thromb* **25**, 294-303, doi:10.5551/jat.RV17020 (2018).
- 5 Bos, D. *et al.* Atherosclerotic Carotid Plaque Composition and Incident Stroke and Coronary Events. *J Am Coll Cardiol* **77**, 1426-1435, doi:10.1016/j.jacc.2021.01.038 (2021).
- 6 Irkle, A. *et al.* Identifying active vascular microcalcification by (18)F-sodium fluoride positron emission tomography. *Nat Commun* **6**, 7495, doi:10.1038/ncomms8495 (2015).
- 7 Joshi, N. V. *et al.* (18)F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: a prospective clinical trial. *Lancet*, doi:10.1016/S0140-6736(13)61754-7 (2013).
- 8 Vesey, A. T. *et al.* F-Fluoride and. *Circ Cardiovasc Imaging* **10**, doi:10.1161/CIRCIMAGING.116.004976 (2017).
- 9 Mechtouff, L. *et al.* Simultaneous assessment of microcalcifications and morphological criteria of vulnerability in carotid artery plaque using hybrid. *J Nucl Cardiol*, doi:10.1007/s12350-020-02400-0 (2020).
- 10 Nadra, I. *et al.* Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res* **96**, 1248-1256, doi:10.1161/01.RES.0000171451.88616.c2 (2005).
- 11 Nadra, I. *et al.* Effect of particle size on hydroxyapatite crystal-induced tumor necrosis factor alpha secretion by macrophages. *Atherosclerosis* **196**, 98-105, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.02.005 (2008).
- 12 Kelly-Arnold, A. *et al.* Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 10741-10746, doi:10.1073/pnas.1308814110 (2013).
- 13 Maldonado, N. *et al.* A mechanistic analysis of the role of microcalcifications in atherosclerotic plaque stability: potential implications for plaque rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **303**, H619-628, doi:10.1152/ajpheart.00036.2012 (2012).
- 14 Vengrenyuk, Y. *et al.* A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14678-14683, doi:10.1073/pnas.0606310103 (2006).
- 15 Sheen, C. R. *et al.* Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification. *J Bone Miner Res*, doi:10.1002/jbmr.2420 (2014).
- 16 Millán, J. L. & Whyte, M. P. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int* **98**, 398-416, doi:10.1007/s00223-015-0079-1 (2016).
- 17 Goettsch, C. *et al.* TNAP as a therapeutic target for cardiovascular calcification - a discussion of its pleiotropic functions in the body. *Cardiovasc Res*, doi:10.1093/cvr/cvaa299 (2020).
- 18 Harmey, D. *et al.* Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by akp2, enpp1, and ank: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol* **164**, 1199-1209 (2004).

- 19 Hessle, L. *et al.* Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9445-9449, doi:142063399 [pii]10.1073/pnas.142063399 (2002).
- 20 Rattazzi, M. *et al.* Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1420-1425, doi:10.1161/01.ATV.0000166600.58468.1b (2005).
- 21 Rosenfeld, M. E. *et al.* Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2587-2592 (2000).
- 22 Aikawa, E. *et al.* Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* **116**, 2841-2850, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.732867 (2007).
- 23 Sun, Y. *et al.* Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification. *Circ Res* **111**, 543-552, doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.267237 (2012).
- 24 Lin, M. E. *et al.* Runx2 deletion in smooth muscle cells inhibits vascular osteochondrogenesis and calcification but not atherosclerotic lesion formation. *Cardiovasc Res* **112**, 606-616, doi:10.1093/cvr/cvw205 (2016).
- 25 Espitia, O. *et al.* Implication of molecular vascular smooth muscle cell heterogeneity among arterial beds in arterial calcification. *PLoS One* **13**, e0191976, doi:10.1371/journal.pone.0191976 (2018).
- 26 Tonelli, M. *et al.* Relation between alkaline phosphatase, serum phosphate, and all-cause or cardiovascular mortality. *Circulation* **120**, 1784-1792, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.851873 (2009).
- 27 Panh, L. *et al.* Association between serum alkaline phosphatase and coronary artery calcification in a sample of primary cardiovascular prevention patients. *Atherosclerosis* **260**, 81-86, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.030 (2017).
- 28 Lammers, W. J. *et al.* Levels of alkaline phosphatase and bilirubin are surrogate end points of outcomes of patients with primary biliary cirrhosis: an international follow-up study. *Gastroenterology* **147**, 1338-1349.e1335; quiz e1315, doi:10.1053/j.gastro.2014.08.029 (2014).
- 29 Abramowitz, M. *et al.* Serum alkaline phosphatase and phosphate and risk of mortality and hospitalization. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 1064-1071, doi:10.2215/CJN.08621209 (2010).
- 30 Krishnamurthy, V. R. *et al.* Associations of serum alkaline phosphatase with metabolic syndrome and mortality. *Am J Med* **124**, 566.e561-567, doi:10.1016/j.amjmed.2010.11.030 (2011).
- 31 Wannamethee, S. G., Sattar, N., Papcosta, O., Lennon, L. & Whincup, P. H. Alkaline phosphatase, serum phosphate, and incident cardiovascular disease and total mortality in older men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 1070-1076, doi:10.1161/ATVBAHA.112.300826 (2013).
- 32 Filipowicz, R. *et al.* Associations of serum skeletal alkaline phosphatase with elevated C-reactive protein and mortality. *Clin J Am Soc Nephrol* **8**, 26-32, doi:10.2215/CJN.12031111 (2013).
- 33 Rutsch, F. *et al.* Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat Genet* **34**, 379-381, doi:10.1038/ng1221 (2003).
- 34 Nitschke, Y. *et al.* Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6. *Am J Hum Genet* **90**, 25-39, doi:10.1016/j.ajhg.2011.11.020 (2012).
- 35 Romanelli, F. *et al.* Overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in endothelial cells accelerates coronary artery disease in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *PLoS One* **12**, e0186426, doi:10.1371/journal.pone.0186426 (2017).
- 36 Goettsch, C. *et al.* Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles. *J Clin Invest* **126**, 1323-1336, doi:10.1172/JCI80851 (2016).

- 37 Lencel, P. *et al.* Cell-specific effects of TNF- α and IL-1 β on alkaline phosphatase: implication for syndesmophyte formation and vascular calcification. *Lab Invest* **91**, 1434-1442, doi:labinvest201183 [pii]10.1038/labinvest.2011.83 (2011).
- 38 Sergienko, E. A., Sun, Q. & Ma, C. T. A method for direct assessment of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) inhibitors in blood samples. *Methods Mol Biol* **1053**, 103-113, doi:10.1007/978-1-62703-562-0_6 (2013).
- 39 Beckonert, O. *et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* **2**, 2692-2703, doi:10.1038/nprot.2007.376 (2007).
- 40 Jacob, D., Deborde, C., Lefebvre, M., Maucourt, M. & Moing, A. NMRProcFlow: a graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics. *Metabolomics* **13**, 36, doi:10.1007/s11306-017-1178-y (2017).
- 41 Pinkerton, A. B. *et al.* Discovery of 5-((5-chloro-2-methoxyphenyl)sulfonamido)nicotinamide (SBI-425), a potent and orally bioavailable tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* **28**, 31-34, doi:10.1016/j.bmcl.2017.11.024 (2018).
- 42 Schierwagen, R. *et al.* Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Sci Rep* **5**, 12931, doi:10.1038/srep12931 (2015).
- 43 Schippers, M. *et al.* Phosphate Groups in the Lipid A Moiety Determine the Effects of LPS on Hepatic Stellate Cells: A Role for LPS-Dephosphorylating Activity in Liver Fibrosis. *Cells* **9**, doi:10.3390/cells9122708 (2020).
- 44 Wong, M. C. *et al.* Hepatocyte-specific IKK β expression aggravates atherosclerosis development in APOE*3-Leiden mice. *Atherosclerosis* **220**, 362-368, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.055 (2012).
- 45 Okin, D. & Medzhitov, R. The Effect of Sustained Inflammation on Hepatic Mevalonate Pathway Results in Hyperglycemia. *Cell* **165**, 343-356, doi:10.1016/j.cell.2016.02.023 (2016).
- 46 Cai, D. *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* **11**, 183-190, doi:10.1038/nm1166 (2005).
- 47 Bessueille, L., Fakhry, M., Hamade, E., Badran, B. & Magne, D. Glucose stimulates chondrocyte differentiation of vascular smooth muscle cells and calcification: A possible role for IL-1 β . *FEBS Lett*, doi:10.1016/j.febslet.2015.07.045 (2015).
- 48 Ceneri, N. *et al.* Rac2 Modulates Atherosclerotic Calcification by Regulating Macrophage Interleukin-1 β Production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **37**, 328-340, doi:10.1161/ATVBAHA.116.308507 (2017).
- 49 Hofmann Bowman, M. A. *et al.* S100A12 in vascular smooth muscle accelerates vascular calcification in apolipoprotein E-null mice by activating an osteogenic gene regulatory program. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 337-344, doi:10.1161/ATVBAHA.110.217745 (2011).
- 50 Gámez-Belmonte, R. *et al.* Deficiency in Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase Leads to Steatohepatitis in Mice Fed a High Fat Diet Similar to That Produced by a Methionine and Choline Deficient Diet. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms22010051 (2020).
- 51 Morita, J. *et al.* Structure and biological function of ENPP6, a choline-specific glycerophosphodiester-phosphodiesterase. *Sci Rep* **6**, 20995, doi:10.1038/srep20995 (2016).
- 52 Li, Z. & Vance, D. E. Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *J Lipid Res* **49**, 1187-1194, doi:10.1194/jlr.R700019-JLR200 (2008).
- 53 Corbin, K. D. & Zeisel, S. H. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. *Curr Opin Gastroenterol* **28**, 159-165, doi:10.1097/MOG.0b013e32834e7b4b (2012).
- 54 Cole, L. K., Dolinsky, V. W., Dyck, J. R. & Vance, D. E. Impaired phosphatidylcholine biosynthesis reduces atherosclerosis and prevents lipotoxic cardiac dysfunction in ApoE $^{-/-}$ Mice. *Circ Res* **108**, 686-694, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.238691 (2011).

- 55 Ehara, S. *et al.* Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation* **110**, 3424-3429, doi:10.1161/01.CIR.0000148131.41425.E9 (2004).
- 56 Whyte, M. P. Hypophosphatasia - aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 233-246, doi:10.1038/nrendo.2016.14 (2016).
- 57 Shi, X. *et al.* Calcification in Atherosclerotic Plaque Vulnerability: Friend or Foe? *Front Physiol* **11**, 56, doi:10.3389/fphys.2020.00056 (2020).
- 58 Whyte, M. P., McAlister, W. H., Mumm, S. & Bierhals, A. J. No vascular calcification on cardiac computed tomography spanning asfotase alfa treatment for an elderly woman with hypophosphatasia. *Bone* **122**, 231-236, doi:10.1016/j.bone.2019.02.025 (2019).
- 59 Van der Heiden, K. *et al.* SPECT/CT imaging of inflammation and calcification in human carotid atherosclerosis to identify the plaque at risk of rupture. *J Nucl Cardiol*, doi:10.1007/s12350-021-02745-0 (2021).
- 60 Jin, H. Y. *et al.* The Relationship Between Coronary Calcification and the Natural History of Coronary Artery Disease. *JACC Cardiovasc Imaging* **14**, 233-242, doi:10.1016/j.jcmg.2020.08.036 (2021).
- 61 Shaw, L. J., Narula, J. & Chandrashekar, Y. The never-ending story on coronary calcium: is it predictive, punitive, or protective? *J Am Coll Cardiol* **65**, 1283-1285, doi:10.1016/j.jacc.2015.02.024 (2015).
- 62 Joshi, F. R. *et al.* Does Vascular Calcification Accelerate Inflammation?: A Substudy of the dal-PLAQUE Trial. *J Am Coll Cardiol* **67**, 69-78, doi:10.1016/j.jacc.2015.10.050 (2016).
- 63 Nakahara, T., Narula, J. & Strauss, H. W. Calcification and Inflammation in Atherosclerosis: Which Is the Chicken, and Which Is the Egg? *J Am Coll Cardiol* **67**, 79-80, doi:10.1016/j.jacc.2015.11.014 (2016).
- 64 Pugliese, G., Iacobini, C., Blasetti Fantauzzi, C. & Menini, S. The dark and bright side of atherosclerotic calcification. *Atherosclerosis* **238**, 220-230, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.011 (2015).
- 65 Halling Linder, C., Englund, U. H., Narisawa, S., Millán, J. L. & Magnusson, P. Isozyme profile and tissue-origin of alkaline phosphatases in mouse serum. *Bone*, doi:10.1016/j.bone.2012.12.048 (2013).
- 66 Alvaro, D. *et al.* The function of alkaline phosphatase in the liver: regulation of intrahepatic biliary epithelium secretory activities in the rat. *Hepatology* **32**, 174-184, doi:10.1053/jhep.2000.9078 (2000).
- 67 Kaliannan, K. *et al.* Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7003-7008, doi:10.1073/pnas.1220180110 (2013).
- 68 Luchtefeld, M. *et al.* Signal transducer of inflammation gp130 modulates atherosclerosis in mice and man. *J Exp Med* **204**, 1935-1944, doi:10.1084/jem.20070120 (2007).

Data supplement

Table I: summary of primers used. Shown are the mouse (m) and human (h) primer sequences (F: forward; R: reverse), annealing temperatures (Ta), base pair (bp) lengths of the corresponding PCR products, and GenBank accession numbers.

Gene (bp)	GenBank	Ta (°C)	Sequence	Length
<i>mAbcg8</i>	NM_001347418.1	60	F: 5'- CTGTGGAATGGGACTGTACTTC-3' R: 5'- GTTGGACTGACCACTGTAGGT-3'	105
<i>mAcan</i>	NM_007424.2	60	F: 5'- GTGCGGTACCAGTGCCTGA-3' R: 5'- GGGTCTGTGCAGGTGATTTCG-3'	104
<i>mActin</i>	NM_007393.3	60	F: 5'- AATTTCTGAATGGCCAGGT-3' R: 5'- GGTAAGGTGTGCACTTTTATTGG-3'	156
<i>mAlpl</i>	NM_007431.3	60	F: 5'- CAAAGGCTTCTTCTTGCTGGT-3' R: 5'- AAGGGCTTCTTGTCCGTGTC-3'	258
<i>mBmp2</i>	NM_007553	60	F: 5'- TGGAAGTGGCCATTTAGAG-3' R: 5'- TGACGCTTTTCTCGTTTGTG-3'	165
<i>mCd68</i>	NM_001291058.1	60	F: 5'- ATCCCCACCTGTCTCTCTCA -3' R: 5'- TTGCATTTCCACAGCAGAAG -3'	216
<i>mColla1</i>	NM_007742.3	60	F: 5'- AACGAGATCGAGCTCAGAGG-3' R: 5'- GACTGTCTTGCCCCAAGTTC-3'	98
<i>mCyp7a1</i>	NM_007824.3	60	F: 5'- GCCCTGAAGCAATGAAAGCAGCCTCT-3' R: 5'- GAGAGCCGCAGAGCCTCCTTGATGA-3'	160
<i>mCyp7b1</i>	NM_007825.4	60	F: 5'- ATGCTCCAAAGGAATTTAGG-3' R: 5'-TCCAAAAGGCATAACGTAAG-3'	107
<i>mHmgcr</i>	NM_001360165.1	60	F: 5'- ATTGTATGTGGCACTGTGATGG-3' R: 5'- CGCTTCAGTTCAGTGCAGG-3'	171
<i>mHp</i>	NM_017370.2	60	F: 5'- TGAGGCAGTGTGTGGGAAG-3' R: 5'- TGGCGGGAGATCATCTTG-3'	114
<i>mHprt</i>	NM_013556.2	60	F: 5'- AGGACCTCTCGAAGTGT-3' R: 5'- ATTCAAATCCCTGAAGTACTCAT-3'	111
<i>mIl-1β</i>	NM_008361.4	60	F: 5'-GGGCCTCAAAGGAAAGAATC-3' R: 5'-CCACTTTGCTCTTGACTTCTATC-3'	152
<i>mIl-6</i>	NM_031168	60	F: 5'-GTCACAGAAGGAGTGGCTA-3' R: 5'-AGAGAACAACATAAGTCAGATACC-3'	193
<i>mIl-8</i>	NM_008176.3	47	F: 5'- AAATAATATTTATTGGG-3' R: 5'- TTTCAAGACATACAAACA-3'	155
<i>mLy6g</i>	NM_001310438.1	60	F: 5'- TTGCAAAGTCCTGTGTGCT-3' R: 5'- AGGGCAGGTAGTTGTGTTG-3'	126

<i>mOpn</i>	NM_001204203.1	60	F: 5'- CTTTCACTCCAATCGTCCCTA-3' R: 5'- GCTCTCTTTGGAATGCTCAAGT-3'	305
<i>mRunx2</i>	NM_009820.5	60	F: 5'- GCCGGGAATGATGAGAACTA-3' R: 5'- GGACCGTCCACTGTCACCTT-3'	200
<i>mRpl13a</i>	NM_009438.5	60	F: 5'- ATCCCTCCACCCTATGACAA-3' R: 5'- GCCCCAGGTAAGCAAACCTT-3'	97
<i>mSox9</i>	NM_011448.4	60	F: 5'- GTACCCGCATCTGCACAAC-3' R: 5'- CTCCTCCACGAAGGGTCTCT-3'	94
<i>MSrebf1</i>	NM_001358314.1	60	F: 5'- GGAGCCATGGATTGCACATT-3' R: 5'- GCTTCCAGAGAGGAGGCCAG-3'	182
<i>mTnfa</i>	NM-013693	60	F: 5'-TGGGACAGTGACCTGGACTGT-3' R: 5'-TTCGGAAAGCCATTTGAGT-3'	67

Figure legends

Figure 1: Representative immunohistochemistry staining of TNAP and RUNX2 in a human calcified carotid atherosclerotic plaque. Calcifications are indicated by *. On the central, low-magnification (x 2.5) photographs, the bar indicates 1 mm; on the high-magnification images (x 40), the bar indicates 50 μ m.

Figure 2: Histological analysis of calcification after osteosense (OS) staining in *ApoE*-deficient mice at 21 weeks (A), 25 weeks (B) and 31 weeks (C). Aortic arch plaques partly (top) or totally (bottom) calcified in 25-week-old mice as imaged by OS (D), alcian blue (E), and oil red O (F). Quantification of calcification number (G) and surface (H) after OS staining at 17 (n=8), 19 (n=8), 21 (n=8), 23 (n=8), 25 (n=6), 27 (n=6), 29 (n=6) and 31 weeks (n=8). Representative *in vivo* imaging with ^{18}F -NaF μ PET/ μ CT of aortic calcification (red arrow) in a 34-week-old mouse (I), and its quantification by μ CT and ^{18}F -NaF μ PET (J). (K) and (L) Quantitative PCR determination of relative transcript levels in the abdominal aorta in *ApoE*-deficient mice at 17 (n=5), 19 (n=6), 21 (n=6), 23 (n=6), 25 (n=6), 27 (n=5), 29 (n=5) and 31 weeks (n=6). Correlation between *Alpl* and *Runx2* levels from 17 to 31 weeks were calculated with Pearson's test. (M) OS staining and TNAP activity staining at 19 weeks (left) and 21 weeks (right). All quantitative results are shown as mean \pm standard deviation, and statistical analyses were performed with one way ANOVA (H) and student's t-test (G,H,I,K,L). CT: computed tomography; NC: necrotic core; OS: osteosense; PET: positron emission tomography; SUV: standardized uptake value ratio.

Figure 3: *in vivo* quantification of calcification volume measured by μ CT (A) and of calcification activity, as measured with ^{18}F -NaF μ PET (B) (n=11 CT mice and n=12 SBI-425 treated mice). Histological quantification of calcification number and surface after OS staining (C), and of plaque surface (D) and lipid surface (E) after oil red O staining. Quantitative PCR determination of relative transcript levels in the abdominal aorta in *ApoE*-deficient mice (n=12 CT mice and n=13 SBI-treated mice) (F). Determination of serum IL-6 levels (n=11 CT mice and n=10 SBI-treated mice) (G). OS staining and CD68 IHC in a representative mouse (H). Serum levels of cholesterol (I) and triglycerides (TGs) (J). Results are shown as mean \pm standard deviation, and statistical analyses were performed with Mann-Whitney U test (A-C) and Student's t-test (D-J). CT: computed tomography; IHC: immunohistochemistry; OS: osteosense; PCR: polymerase chain reaction; PET: positron emission tomography SBI: SBI-425; SUVr: standardized uptake value ratio.

Figure 4: Quantification in the serum of *ApoE*-deficient mice of cholesterol levels (A), TG levels (D), haptoglobin levels (G), glucose levels (H), or TNAP activity (J). Quantification in the liver of *ApoE*-deficient mice of cholesterol levels (B), bile acid levels (C), TG levels (E). RT-qPCR determination of relative transcript levels in the liver of *ApoE*-deficient mice (F,I). Results are shown as mean \pm standard deviation, and statistical analyses were performed with student's t-test at 17 (n=5), 19 (n=6), 21 (n=6), 23 (n=6), 25 (n=6), 27 (n=5), 29 (n=5) and 31 weeks (n=6).

Figure 5: Hypothetical model in *ApoE*-deficient mice, linking liver metabolism to serum levels of metabolic and inflammatory factors and atherosclerotic plaque development. TG: triglycerides.

Figure 6: Quantification in the liver of *ApoE*-deficient mice at 25 weeks of levels of TGs (A), haptoglobin (C), hydroxyproline (E), cholesterol (F), bile acids (H), phosphocholine (J) (n=13 CT mice and n=13 SBI-425 treated mice). Quantification in the kidney of *ApoE*-deficient mice of phosphocholine levels (K). Quantitative PCR determination of relative transcript levels in the liver in *ApoE*-deficient mice treated or not with SBI-425 (B,G). Correlation between liver and kidney phosphocholine levels, in untreated mice (left) or mice treated with SBI-425 (right) (L). Dephosphorylation of phosphocholine or phosphoethanolamine by mouse (left) or human (right) TNAP in presence or absence of MLS-0038949 (M). Association between liver phosphocholine levels and liver levels of TGs or cholesterol (N). Results are shown as mean \pm standard deviation, and statistical analyses were performed with student's t-test. Correlations were calculated with Pearson's test. TG: triglycerides.

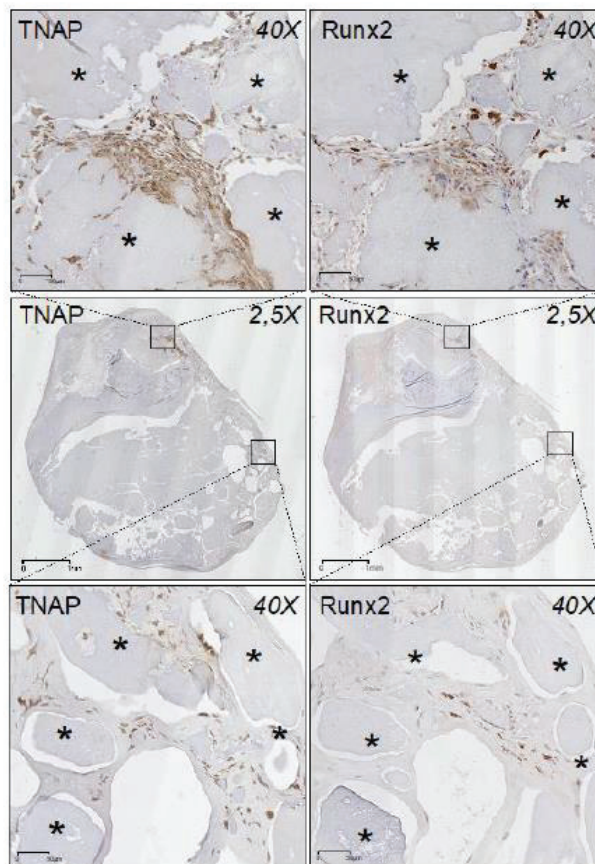
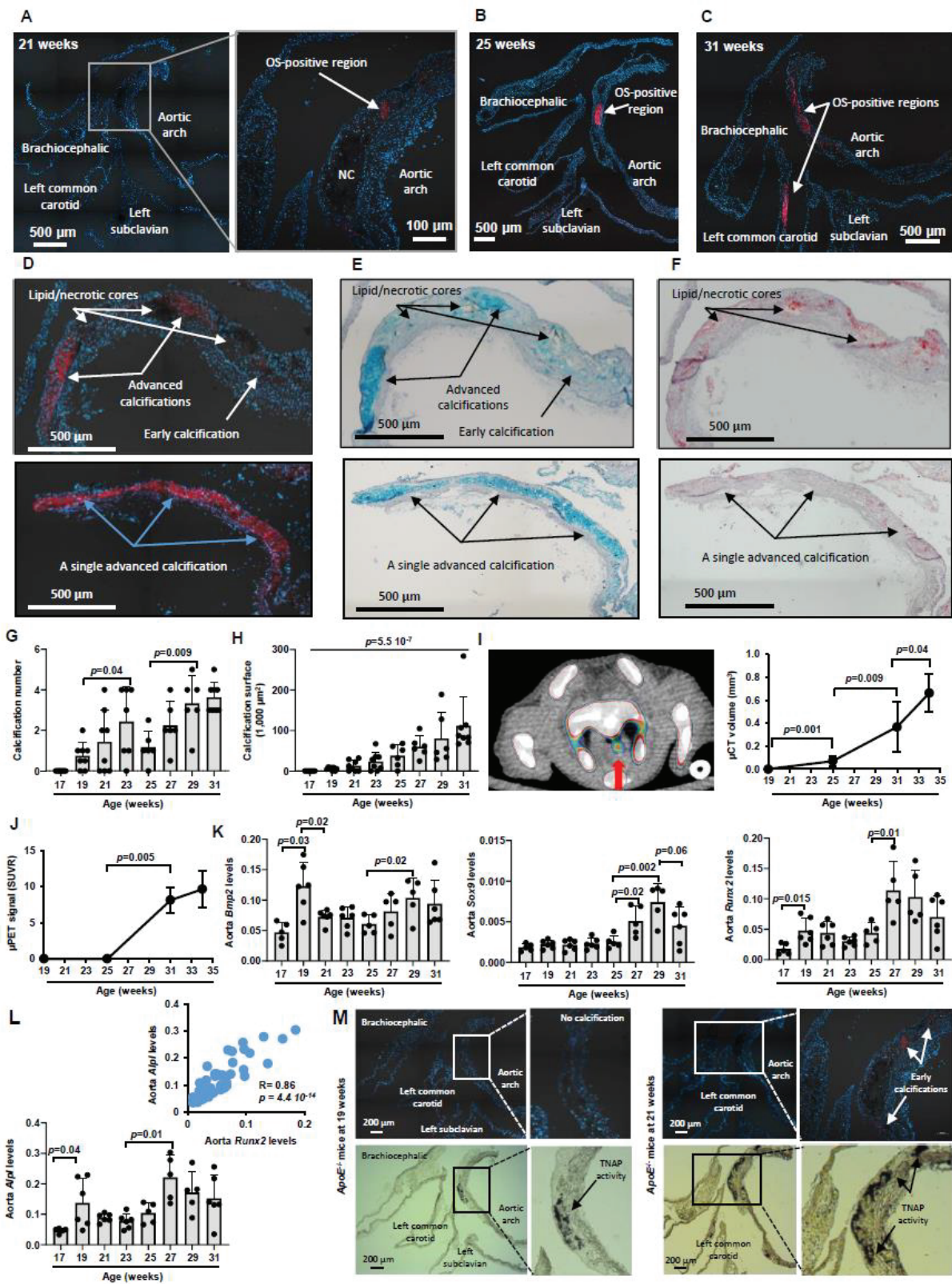


Figure 1: Representative immunohistochemistry staining of TNAP and RUNX2 in a human calcified carotid atherosclerotic plaque. Calcifications are indicated by *. On the central, low-magnification (x 2.5) photographs, the bar indicates 1 mm; on the high-magnification images (x 40), the bar indicates 50 μ m.

Figure 2: Histological analysis of calcification after osteosense (OS) staining in *ApoE*-deficient mice at 21 weeks (A), 25 weeks (B) and 31 weeks (C). Aortic arch plaques partly (top) or totally (bottom) calcified in 25-week-old mice as imaged by OS (D), alcian blue (E), and oil red O (F). Quantification of calcification number (G) and surface (H) after OS staining at 17 (n=8), 19 (n=8), 21 (n=8), 23 (n=8), 25 (n=6), 27 (n=6), 29 (n=6) and 31 weeks (n=8). Representative *in vivo* imaging with ^{18}F -NaF μ PET/ μ CT of aortic calcification (red arrow) in a 34-week-old mouse (I), and its quantification by μ CT and ^{18}F -NaF μ PET (J). (K) and (L) Quantitative PCR determination of relative transcript levels in the abdominal aorta in *ApoE*-deficient mice at 17 (n=5), 19 (n=6), 21 (n=6), 23 (n=6), 25 (n=6), 27 (n=5), 29 (n=5) and 31 weeks (n=6). Correlation between *Alpl* and *Runx2* levels from 17 to 31 weeks were calculated with Pearson's test. (M) OS staining and TNAP activity staining at 19 weeks (left) and 21 weeks (right). All quantitative results are shown as mean \pm standard deviation, and statistical analyses were performed with one way ANOVA (H) and student's t-test (G,H,I,K,L). CT: computed tomography; NC: necrotic core; OS: osteosense; PET: positron emission tomography; SUVr: standardized uptake value ratio.



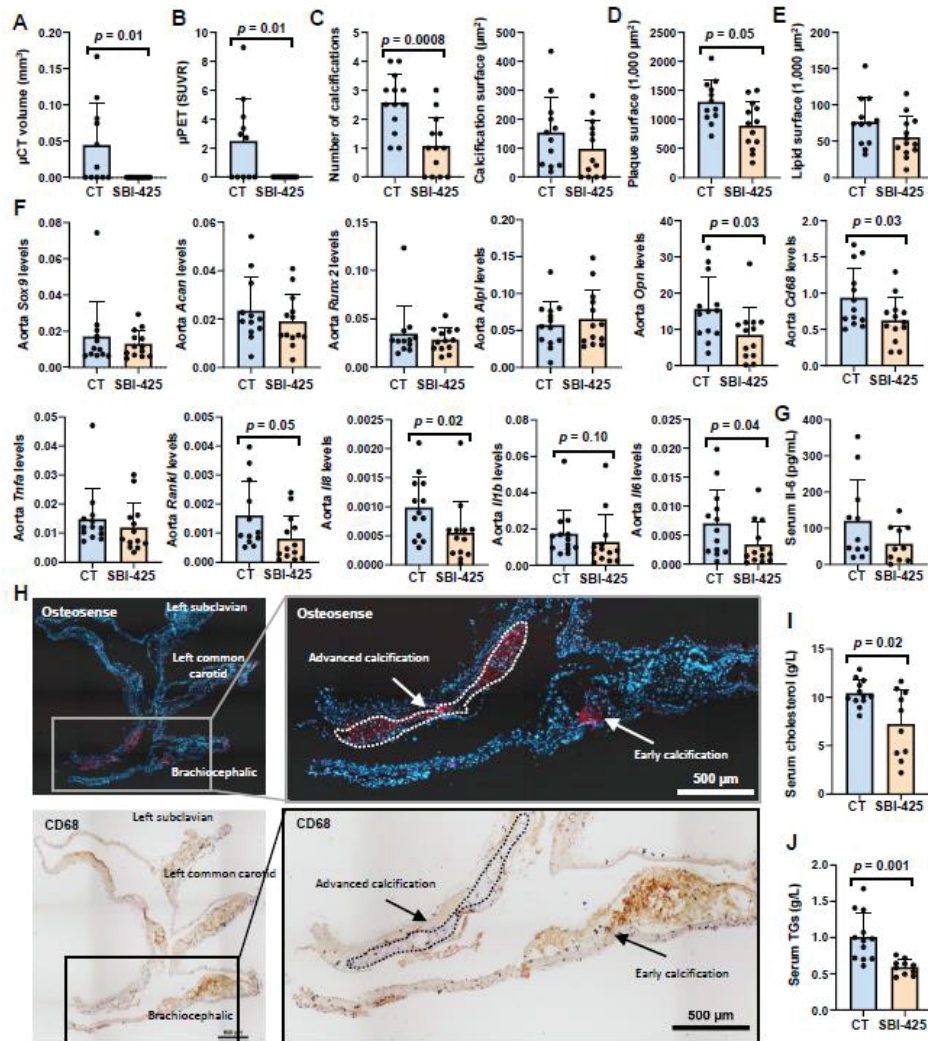


Figure 3: *in vivo* quantification of calcification volume measured by μ CT (A) and of calcification activity, as measured with ^{18}F -NaF μ PET (B) ($n=11$ CT mice and $n=12$ SBI-425 treated mice). Histological quantification of calcification number and surface after OS staining (C), and of plaque surface (D) and lipid surface (E) after oil red O staining. Quantitative PCR determination of relative transcript levels in the abdominal aorta in *ApoE*-deficient mice ($n=12$ CT mice and $n=13$ SBI-425-treated mice) (F). Determination of serum IL-6 levels in 11 CT mice and $n=10$ SBI-425-treated mice (G). OS staining and CD68 IHC in a representative mouse (H). Serum levels of cholesterol (I) and triglycerides (TGs) (J). Results are shown as mean \pm standard deviation, and statistical analyses were performed with Mann-Whitney U test (A-C) and Student's t-test (D-J). CT: computed tomography; IHC: immunohistochemistry; OS: osteosense; PCR: polymerase chain reaction; PET: positron emission tomography SBI: SBI-425; SUVr: standardized uptake value ratio.

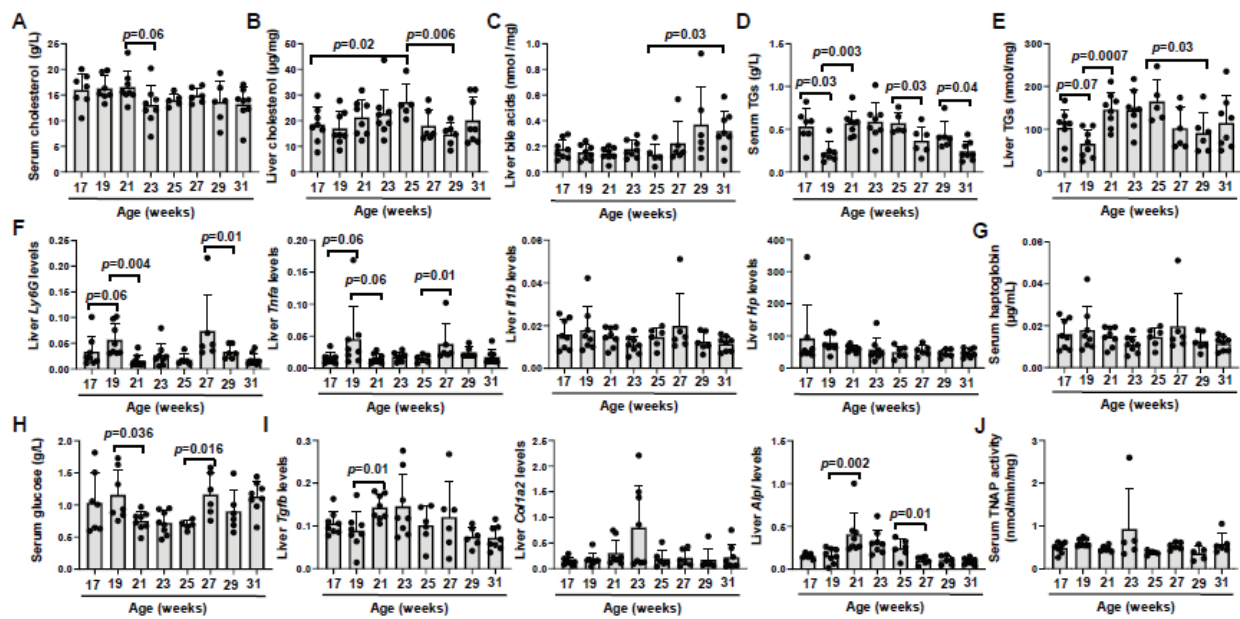


Figure 4: Quantification in the serum of *ApoE*-deficient mice of cholesterol levels (A), TG levels (D), haptoglobin levels (G), glucose levels (H), or TNAP activity (J). Quantification in the liver of *ApoE*-deficient mice of cholesterol levels (B), bile acid levels (C), TG levels (E). RT-qPCR determination of relative transcript levels in the liver of *ApoE*-deficient mice (F,I). Results are shown as mean ± standard deviation, and statistical analyses were performed with student's t-test at 17 (n=5), 19 (n=6), 21 (n=6), 23 (n=6), 25 (n=6), 27 (n=5), 29 (n=5) and 31 weeks (n=6).

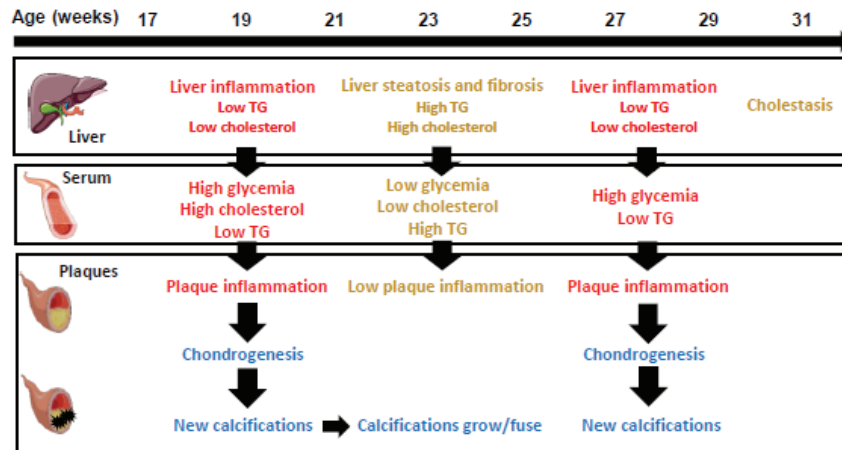


Figure 5: Hypothetical model in *ApoE*-deficient mice, linking liver metabolism to serum levels of metabolic and inflammatory factors and atherosclerotic plaque development. TG: triglycerides.

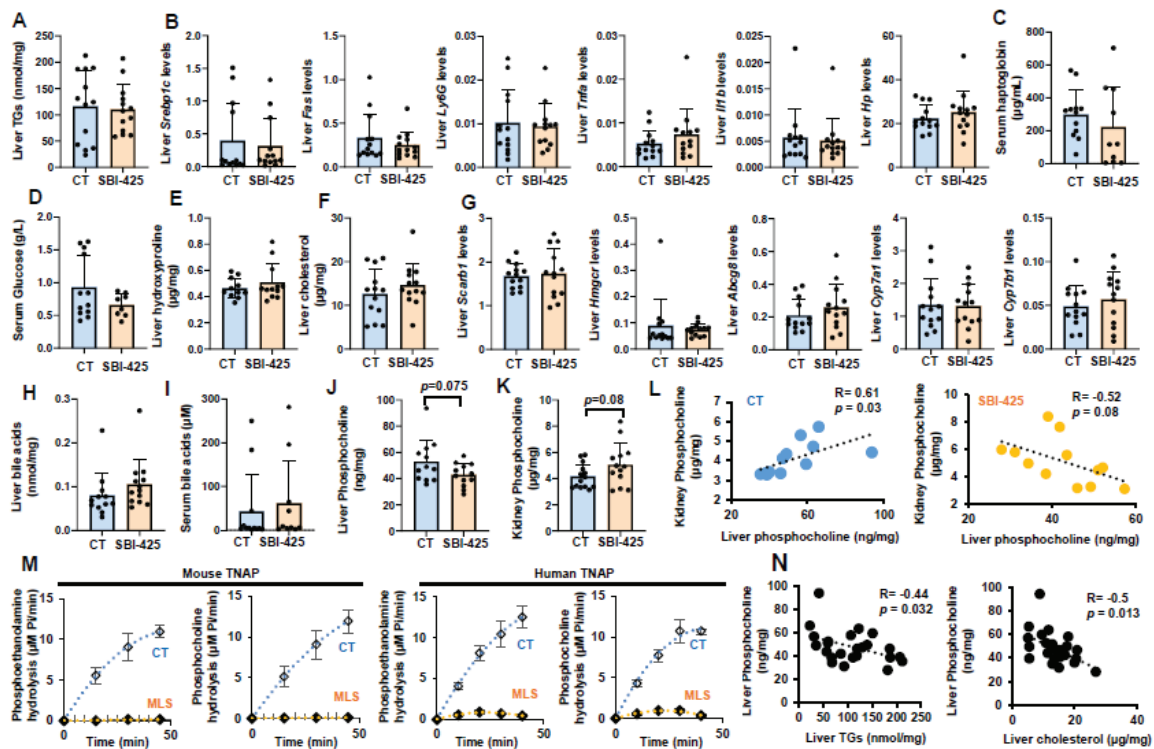
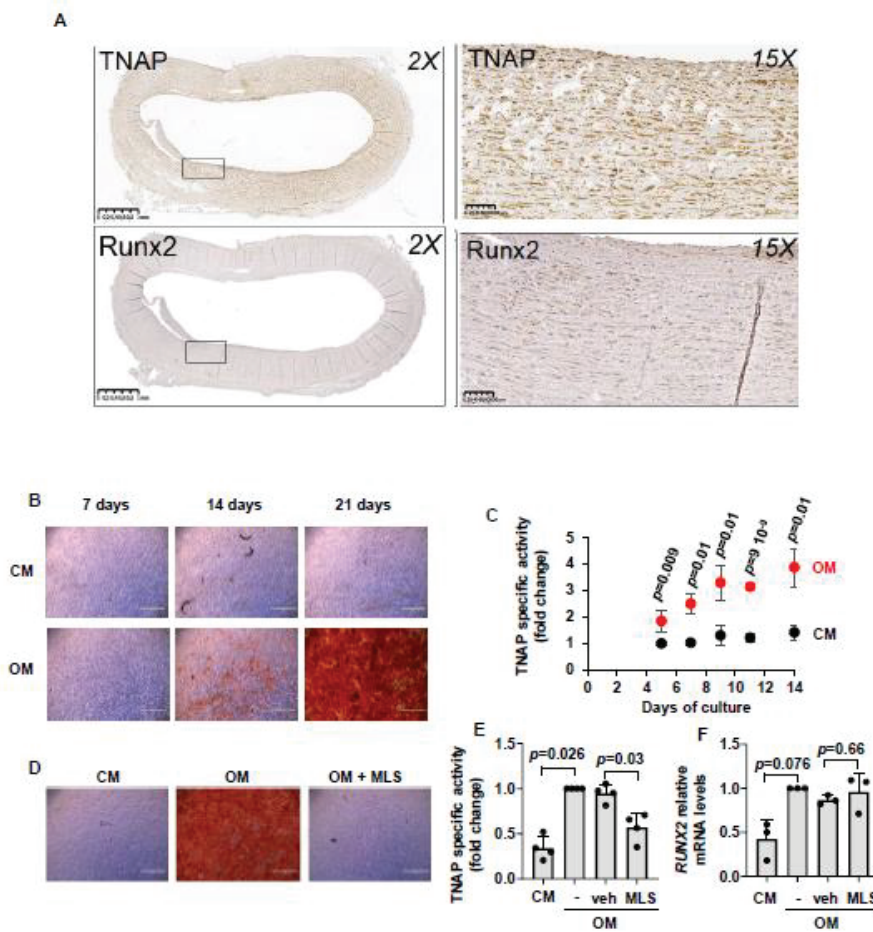
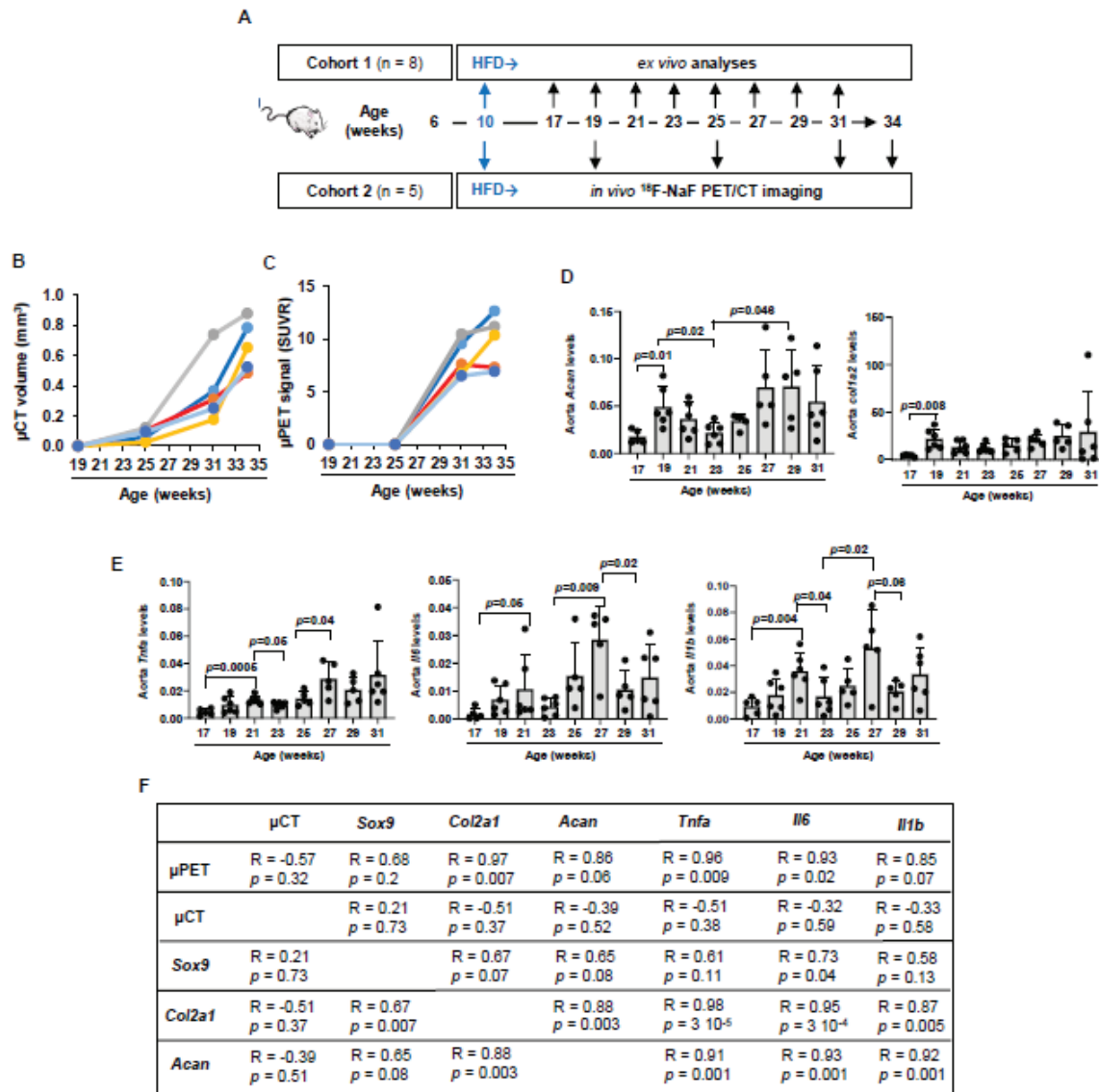


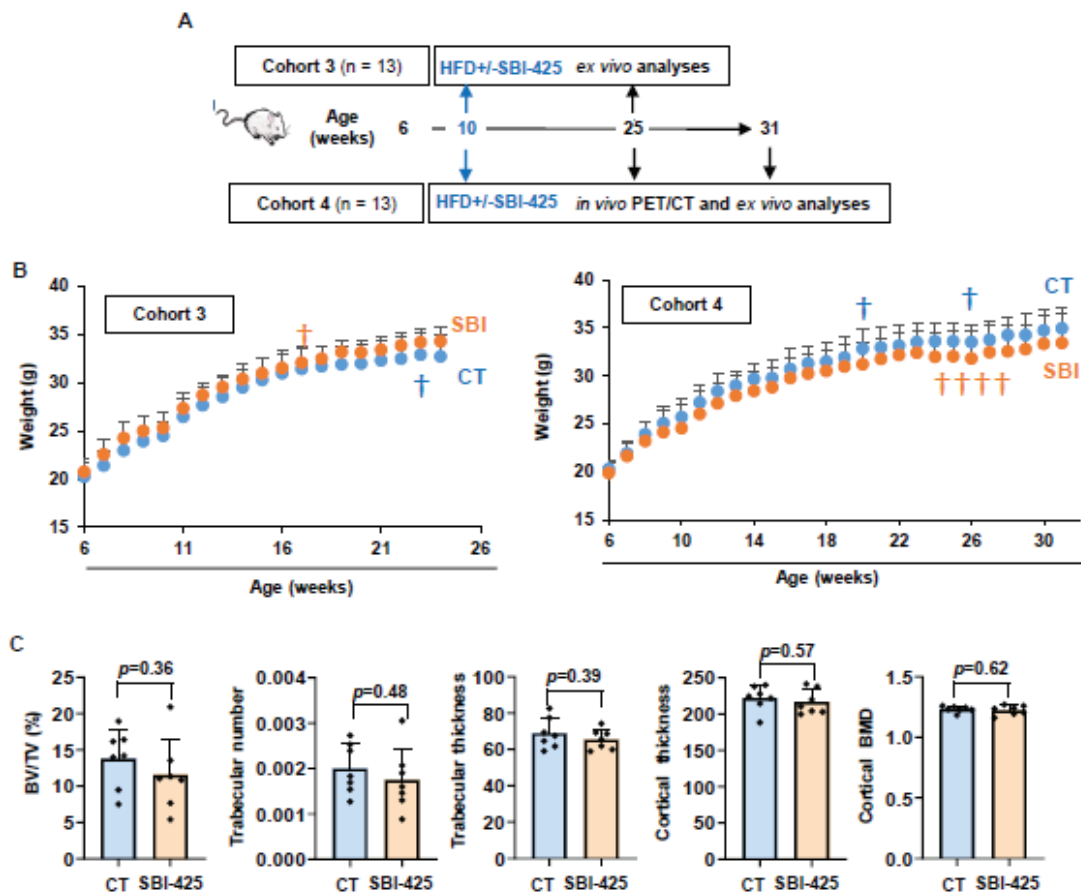
Figure 6: Quantification in the liver of *ApoE*-deficient mice at 25 weeks of levels of TGs (A), haptoglobin (C), hydroxyproline (E), cholesterol (F), bile acids (H), phosphocholine (J) ($n=13$ CT mice and $n=13$ SBI-425 treated mice). Quantification in the kidney of *ApoE*-deficient mice of phosphocholine levels (K). Quantitative PCR determination of relative transcript levels in the liver in *ApoE*-deficient mice treated or not with SBI-425 (B,G). Correlation between liver and kidney phosphocholine levels, in untreated mice (left) or mice treated with SBI-425 (right) (L). Dephosphorylation of phosphocholine or phosphoethanolamine by mouse (left) or human (right) TNAP in presence or absence of MLS-0038949 (M). Association between liver phosphocholine levels and liver levels of TGs or cholesterol (N). Results are shown as mean \pm standard deviation, and statistical analyses were performed with student's t-test. Correlations were calculated with Pearson's test. TG: triglycerides.



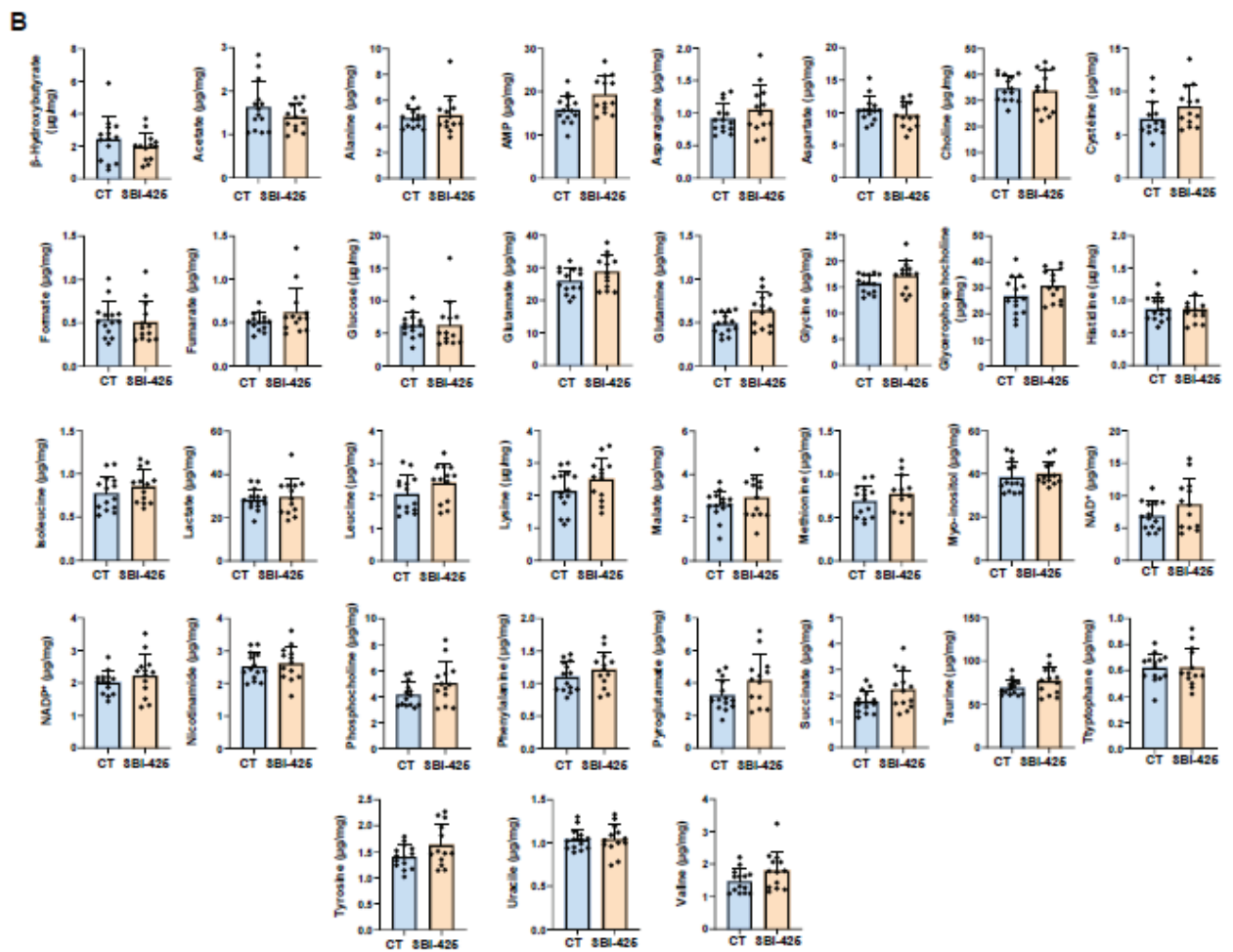
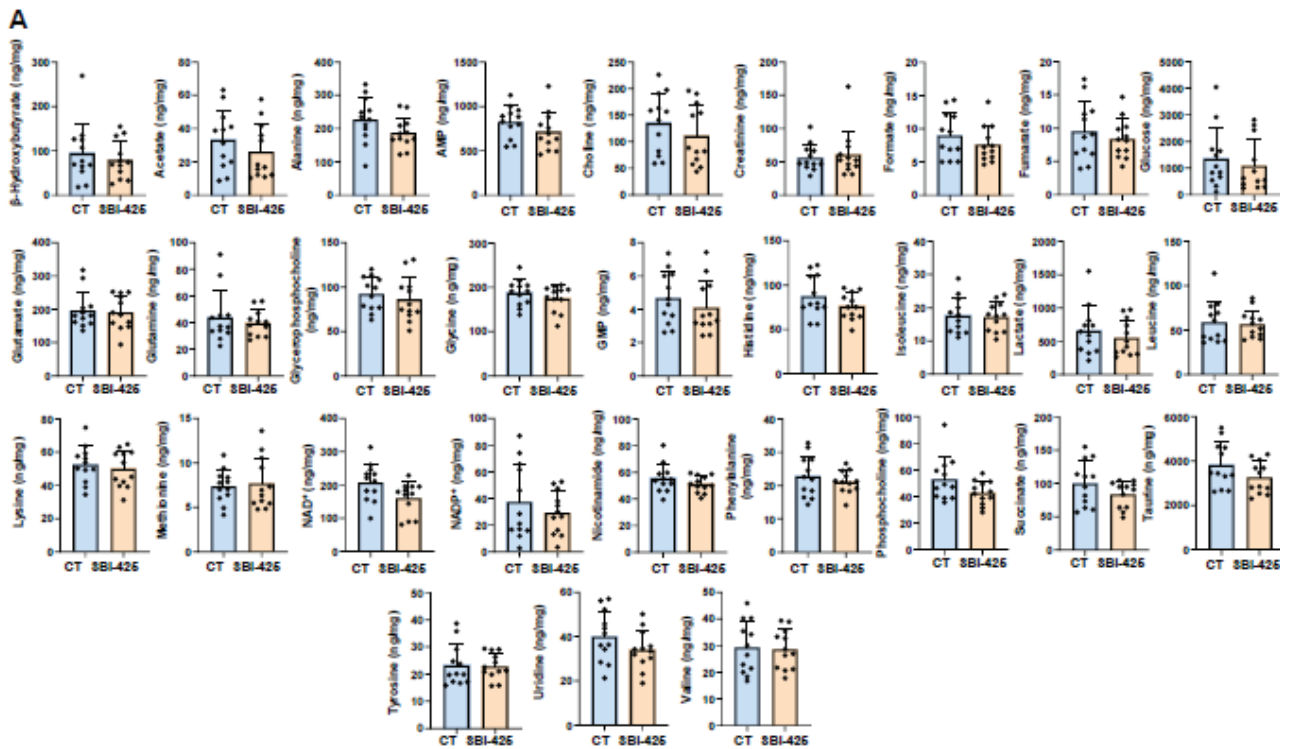
Supplemental Figure 1: Representative IHC staining of TNAP and RUNX2 in a healthy human carotid with no plaque (A). On the left, low-magnification (2x) photographs, the bar indicates 1 mm; on the high-magnification images (15x), the bar indicates 100 μ m. Alizarin red staining of calcium deposits in representative cultures of human VSMCs grown in CM or OM for 7, 14 or 21 days (B). Evolution during time of TNAP activity in human VSMCs cultured in CM or OM (C). Effect of MLS-0038949 on calcification (D), TNAP activity (E), and *RUNX2* transcript levels (F) at 21 weeks. Results are shown as mean \pm standard deviation, and statistical analyses were performed with Mann-Whitney U test. CM: control medium; IHC: immunohistochemistry; MLS: MLS-0038949; OM: osteogenic medium; VSMC: vascular smooth muscle cell.



Supplemental Figure 2: *ApoE*-deficient mice fed a HFD from 10 weeks of age, were analyzed every two weeks after sacrifice (cohort 1), and *in vivo* at 19, 25, 31 and 34 weeks (cohort 2) (A). *in vivo* quantification of calcification with μ CT (B) and ^{18}F -NaF μ PET (C) (each color represents a mouse). Quantitative RT-qPCR determination of relative transcript levels in the abdominal aorta in *ApoE*-deficient mice at 17 (n=5), 19 (n=6), 21 (n=6), 23 (n=6), 25 (n=6), 27 (n=5), 29 (n=5) and 31 weeks (n=6) (D and E). Correlations were calculated with Pearson's test. Results are shown as mean \pm standard deviation, and statistical analyses were performed with student's t-test (F). CT: computed tomography; HFD: high fat diet; PET: positron emission tomography; SUVR: standardized uptake value ratio.



Supplemental Figure 3: SBI-425 was administered from 10 weeks of age in *ApoE*-deficient mice and calcification was monitored after sacrifice in cohort 3, or *in vivo* and after sacrifice in cohort 4 (A). Weight gain in *ApoE*-deficient mice treated or not with SBI-425 in cohorts 3 and 4; + indicates a death (B). Bone architecture parameters determined at 31 weeks in *ApoE*-deficient mice treated or not with SBI-425 in cohort 3 (B, n=7 per group) (C). Results are shown as mean \pm standard deviation. In B, statistical analyses were performed with student t-test. BMD: bone mineral density; BV: bone volume; CT: control (untreated mice); SBI: SBI-425; Tb: trabecular; TV: total volume.



Supplemental Figure 4: Quantification of metabolite levels in the liver (A, ng/mg of tissue) and kidney (B, $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) as determined by NMR-metabolomics.