



HAL
open science

Implication du canal cationique TRPM4 dans le remodelage radio-induit de la valve aortique

Harlyne Mpweme Bangando

► **To cite this version:**

Harlyne Mpweme Bangando. Implication du canal cationique TRPM4 dans le remodelage radio-induit de la valve aortique. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMC415 . tel-03947237

HAL Id: tel-03947237

<https://theses.hal.science/tel-03947237v1>

Submitted on 19 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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS -
INTERACTIONS**

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Implication du canal cationique TRPM4 dans le remodelage radio-induit de la valve aortique

Présentée et soutenue par
HARLYNE MPWEME BANGANDO

Thèse soutenue le 14/12/2022
devant le jury composé de

MME MARIE DEMION	Maître de conférences HDR, UNIVERSITE MONTPELLIER 1	Rapporteur du jury
M. MATHIEU GAUTIER	Professeur des universités, UNIVERSITE AMIENS PICARDIE JULES VERNE	Rapporteur du jury
MME CLARISSE VANDEBROUCK	Maître de conférences HDR, UNIVERSITE POITIERS	Membre du jury
M. JOACHIM ALEXANDRE	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Caen Normandie	Président du jury
M. ROMAIN GUINAMARD	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par **ROMAIN GUINAMARD (Physiopathologie et Stratégies d'Imagerie du Remodelage cardiovasculaire)**



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement

UR 4650



Physiopathologie et
Stratégie d'
Imagerie du
Remodelage cardiovasculaire

A Maman

Merci d'avoir fait de mes rêves tiens

A Papi Lejeune et Papi Jérôme

A Agnès

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma gratitude, à travers ces quelques mots, à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse et à la réalisation de ce travail.

Premièrement, je voudrais adresser mes sincères remerciements et ma gratitude au professeur Romain GUINAMARD. Merci de m'avoir accordé votre confiance et donné l'opportunité de travailler avec vous. Je vous remercie aussi pour la pédagogie, le temps, la patience et l'attention dont j'ai bénéficié. Je réalise la chance que j'ai de vous avoir comme directeur de thèse. Merci pour tout et surtout merci de m'avoir ouvert les portes de votre maison plus d'une fois. J'en profite pour remercier votre femme Odile ainsi que les enfants GUINAMARD.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail : le docteur Marie DEMION, le professeur Mathieu GAUTIER, le docteur Clarisse VANDEBROUCK et le professeur Joachim ALEXANDRE. Merci de m'accorder votre temps et votre expertise.

Je tiens à remercier le docteur Isabelle DHENNIN-DUTHILLE qui a accompagné mes premiers pas dans la recherche et qui a également accepté de faire partie du comité de suivi individuel de cette thèse. Je remercie aussi les autres membres qui m'ont accompagnée durant ces trois années : le professeur Michaël AUBERT, le docteur Stéphane SEBILLE et le docteur Celia SEILLIER.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de Physiopathologie et Stratégies d'Imagerie du Remodelage cardiovasculaire (PSIR, UR 4650), pour leur accueil et tous les bons moments passés ensemble. Je tiens tout d'abord à remercier le directeur du laboratoire, le professeur Alain MANRIQUE, pour la formation aux techniques d'imagerie et son aide pour les expérimentations. Je remercie également le docteur Christophe SIMARD pour son aide dans les différentes expérimentations et le professeur Laurent SALLE de m'avoir permis d'encadrer les travaux pratiques de l'unité d'enseignement dont il est responsable. J'adresse mes remerciements aux autres membres de l'équipe qui ont aussi contribué à ce travail : docteur Alexandre HARFOUSH, Samuel DESHAYES, Alexandre LEBRUN, Arthur BOILEVE, Pierre-Antoine DUPONT, Margaux AIZE et Laura BRARD. Merci également au personnel de

Cyceron et membres adoptifs du laboratoire : Céline BROCQUEHAYE (Tata Céline), Ahmed ABBAS, Christèle LEBouleux et Jean-Marc MADONNET. Merci à tous pour votre aide et de toujours me dépanner. Je vais garder que le meilleur de cette expérience.

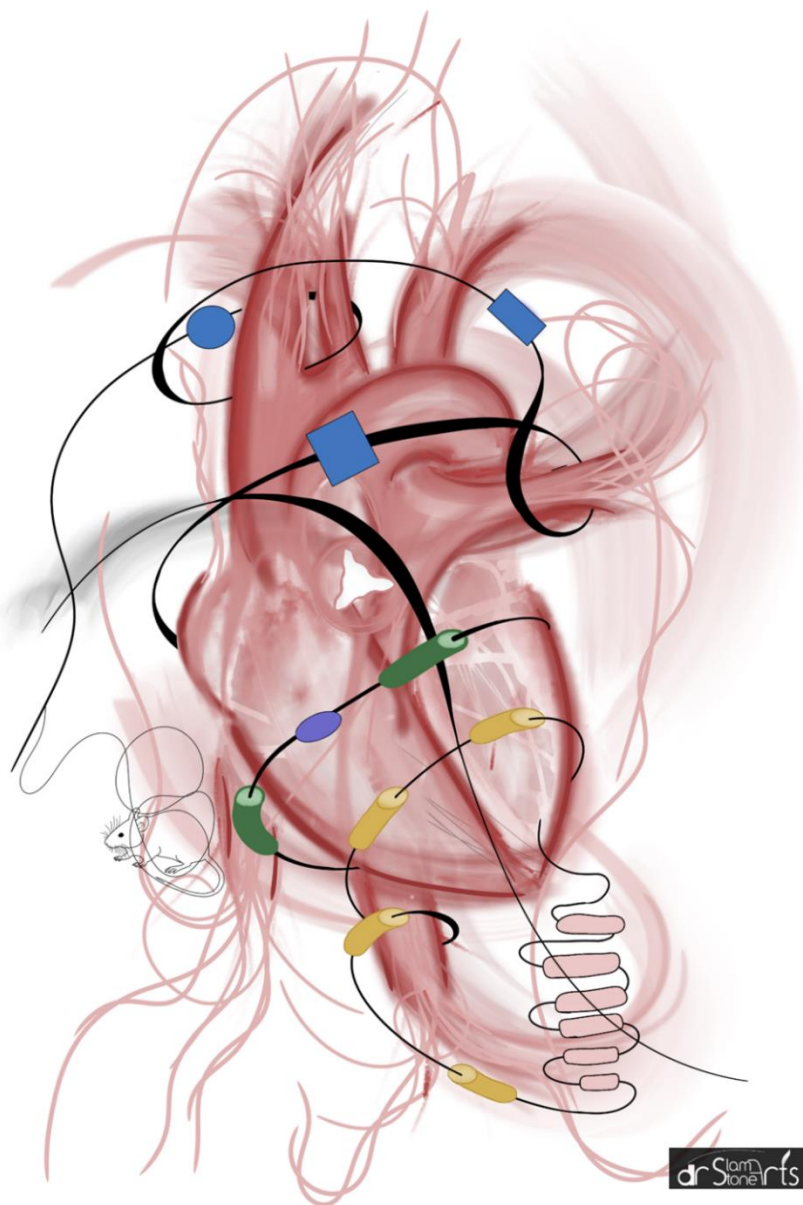
Je tiens aussi à remercier tout le personnel de Cyceron, particulièrement Michaël NAVEAU pour son aide en IRM ainsi que le personnel du CURB pour avoir pris soin des petites souris ; spécialement Céline LEROY. J'exprime également ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidé dans les expérimentations : Quentin DUPAS, Nicolas ELI et Maëlle GUYOT qui m'a aidée et formée pour toute la partie histologie.

Je remercie ma famille pour cet environnement chaleureux dont je bénéficie. Je tiens à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à mes parents. Merci pour vos prières, votre soutien et votre confiance. Merci de toujours respecter et soutenir mes choix. Merci à mon papa Justin MPWEME, mon petit frère (mon jumeau) Ken MPWEME et ma maman Vavie MAKILA. Maman, ta petite Harlyne est devenue une femme, tu n'as plus à t'inquiéter pour moi. Un grand merci à mes oncles : tonton Pierre MAKILA et tonton Eduardo MAKILA. Dieu seul sait tout ce que je vous dois. Je vous remercie ainsi que vos familles respectives. Grâce à vous, je me suis toujours sentie à la maison dès mon premier jour en France. Je remercie également mes grands-parents : papi Lejeune BONGOKA, mamie Antoinette MBOKO, papi Jérôme MAKILA et mamie Elisabeth MAMPUYA. Merci aussi à ma yaya/tata Lawrence BALIMBA. Vous êtes les meilleurs.

Merci à mes amis d'ici et d'ailleurs, la famille est acquise et les amis se méritent. Au cours de ces trois dernières années, je me suis rendu compte de combien vous êtes précieux. C'est dans les moments difficiles qu'on reconnaît ses vrais amis. Merci de me supporter et toujours être là pour moi. La team CEKA : Tom, Alliance, Nancy, Sina, Tamara, Samuel, Felly, Emmanuel, Dollyfa et Jean Baptiste. CEKA cœur comme je vous appelle, loin des yeux mais si près du cœur. Merci pour tout cet amour malgré les années de séparation, les fous rires, les encouragements et la motivation. Merci à mes amiénois de cœur : Karelle, Sirène, Hugues, Mamadi, Angela, Nènè et Arielle. Dr Tom MUBENGA, merci associé de m'écouter et de jouer au psy. Mme Nènè Satourou DIAKITE, nous en avons parcouru du chemin depuis la résidence saint Leu. Merci pour tout, la maman de mes filleules. Arielle OMEME ADA, merci pour ces allers-retours entre Amiens et Caen, d'accourir au premier coup de fil, de me suivre dans mes folies sans me juger et pour toutes ses virées pour décompresser. Angela JULIENNE, merci pour tous les moments que nous avons passés ensemble : les repas, les balades et les soirées. Tu as

égayé ma vie à Caen, ma guide normande. Merci au Dr Boston MAFUTA pour cette magnifique œuvre qui résume bien ce travail. A la team de docteurs, je suis fière de nous et c'est humblement que je rejoins la famille : Dr Aissata CISSE, tu es un exemple de courage et de persévérance, Dr Eli KPELLY, Dr Armelle LOKOSSOU, Dr Aya HAMZA, Dr Arielle OMEME. Je souhaite du courage aux doctorants : Angela et Pietro. Bien que nous ne soyons pas dans le même domaine, c'est plus facile de cheminer à plusieurs. Je suis contente de quitter la bande.

Et enfin à toutes les lumières qui ont éclairé mon chemin durant ces trois années et bien plus : MERCI, MATONDO, EBOTO.



LISTE DES ABREVIATION

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine	FGF : facteur de croissance des fibroblastes
ADAMT: A Disintegrin and Metalloprotease with thrombospondin motifs	FHF: first heart field
ALP/ALPL : phosphatase alcaline	FR: fraction de raccourcissement
AngI/II : angiotensine I/II	FZD : récepteur frizzled
Ao : aorte	G : cuspside coronaire gauche
ApoE : apolipoprotéine E	GABA : acide gamma-aminobutyrique
AT1R : récepteur de l'AngII de type 1	GAG : glycosaminoglycane
ATX : autotaxine	GWAS : étude d'association pangénomique
AVA : aire de la valve aortique	Hbfgf: heparin binding EGF like growth
AVC : bourgeon atrioventriculaire	HEK: human embryonic kidney cells
AVC : canal atrioventriculaire	HIF-1 α : hypoxia inducible factor-1 alpha
aVIC : VIC activée	HMGB1 : high-mobility group box 1
BMP : protéine osseuse morphogénétique	HMG-CoA : réductase
BMPR1A/2 : récepteur de BMP de type 1A/2	Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase
Bpm : battements par minute	HOTAIR : HOX transcript antisense RNA
BTP2 : 3,5-bis (trifluorométhyl) pyrazole	HSP : Heat Shock Protein
CBA : acide 4-chloro-2-[[2-(2-chlorophénoxy) acétyl] amino] benzoïque	HUVECs : human umbilical vascular Endothelial Cell
ChM-1 : chondromoduline-1,	IC ₅₀ : concentration de demi-inhibition
COX-2 : cyclo-oxygénase 2	ICAM-1 : intercellular cell adhesion molecule
CPC : cellule progénitrice cardiaque	IGF-1: insulin growth factor 1
CT2MD : Computed tomography to material density	IL-1/6/18: interleukine
D : cuspside coronaire droit	IRM : imagerie par résonance magnétique
DALY : espérance de vie corrigée de l'incapacité	IVS : septum interventriculaire.
DFSC : cellule souche du follicule dentaire	LA : left atrium
DIVGs/DIVGd : diamètre intraventriculaire du ventricule gauche en systolique et diastolique	LBA : acide 4-chloro-2-(2-(4-chloro-2-méthylphénoxy) propanamido) benzoïque
EC ₅₀ : concentration de demi-efficacité	LDL : Lipoprotéine de basse densité
EDP : produit de dégradation de l'élastine,	LDLR : récepteur des lipoprotéines de basse densité
ERC : complexe récepteur de l'élastine,	LLC : grand complexe latent
EMT : transition endothélio-mésenchymateuse	Lp(a)/LPA : lipoprotéine(a),
eNOS : oxyde nitrique synthase endothéliale	LPA : acide lysophosphatidique
ERK : extracellular signal-regulated kinases	LPAR1 : récepteur de LPA 1
FC : fréquence cardiaque	LPC : lysophosphatidylcholine
FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche	Lp-PLA2 : phospholipase A2 associée aux lipoprotéines
	LPS: lipopolysaccharide
	Lrp5 : low-density lipoprotein receptor-related protein 5,
	LV : left ventricle ventricule gauche

MAPK : Mitogen-activated protein kinases
 MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1
 MEC : matrice extracellulaire
 MHRs : régions d'homologie des TRPM
 MMP : métalloprotéase matricielle
 Msx : muscle segment homeobox
 myoVIC : cellule interstitielle valvulaire myofibroblastique
 NAV1 : neurone navigator 1
 NBA : acide 4-chloro-2-(1-naphthoxyacétamido) benzoïque
 NC : cuspidé non-coronaire
 NCC : cellules de la crête neurale cardiaque
 NFATc1 : facteur nucléaire des lymphocytes T activés cytoplasmiques 1
 NF- κ B : facteur nucléaire kappa B
 obVIC : cellule interstitielle valvulaire ostéoblastique.
 OD : oreillette droite
 OFT : outflow tract/voie d'éjection
 OG : oreillette gauche
 OPG : ostéoprotégérine
 ox-LDL : LDL oxydées
 oxPL : phospholipide oxydé
 PA : artère pulmonaire
 PA : potentiel d'action
 PALMD : palmdelphin
 PIP2 : phosphatidyl inositol biphosphate
 PKA : protéine kinase A
 PKC : protéine kinase C
 PKG : protéine kinase G
 PPVG : paroi postérieure du ventricule gauche.
 Pu : artère pulmonaire
 pVIC : cellule interstitielle valvulaire progénitrice
 qVIC : cellule interstitielle valvulaire quiescente
 RA : right atrium
 RANK : récepteur activateur du facteur nucléaire κ B
 RANKL : ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire κ B
 RNS : espèces réactives de l'azote
 ROS : espèces réactives de l'oxygène

Runx2 : facteur de transcription lié à Runt 2
 RV : ventricule droit
 RVA : remplacement de la valve aortique
 RX : rayon X
 S1P : sphingosine -1-phosphate
 SA : sténose aortique
 SHF: second heart field
 SIVs/SIVd : Septum interventriculaire télédiastolique/télésystolique
 SMAD: small mothers against decapentaplegic
 SMC : cellule musculaire lisse
 SMemb : embryonic non muscle myosin heavy chain
 SOC : store operated calcium
 Sox9: SRY (sex-determining region Y) -box 9
 TAVI : transcatheter aortic valve implantation
 Tbx20 : T-box 20
 TGF- β : facteur de croissance transformant
 TGF- β R : récepteur de TGF- β 1
 Tie-2: tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains
 TIMP : inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases matricielles
 TLR : toll-like receptor
 TNFR1 : récepteur du facteur de nécrose tumorale
 TNF- α : facteur de nécrose tumorale α
 tPA: tissue plasminogen activator
 TRP: transient receptor potential
 TRPA: transient receptor potential akryrin
 TRPC: transient receptor potential canonical
 TRPM: transient receptor potential melastatin
Trpm4^{-/-}: Souris TRPM4 knock-out
Trpm4^{+/+}: Souris TRPM4 sauvage
 TRPML: transient receptor potential mucolipin
 TRPN: transient receptor potential no-mechano-potential
 TRPP : transient receptor potential polycystin
 TRPV : transient receptor potential vanilloid
 TWAS : étude d'association pantranscriptomique

V : ventricule
VA : valve aortique
VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1
VD : ventricule droit
VEC : cellule endocardique valvulaire
VEC : cellule endothéliale valvulaire
VE-cadhérine : cadhérine endothéliale vasculaire
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR : récepteur de VEGF
VEi : l'indice de vitesse Doppler

VG : ventricule gauche
VIC : cellule interstitielle valvulaire
VM : valve mitrale
Vmax/ Vmoy : vitesse transvalvulaire maximale/moyenne
Wnt: wingless-related integration site
 α -SMA : alpha-actine du muscle lisse
 ΔP_{max} / ΔP_{moy} : gradient de pression transvalvulaire maximal/moyen

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des Figures

Figure I-1 : Structure anatomique du cœur humain en coupe coronale	1
Figure I-2 : Coupe histologique du cœur et schéma de ses trois couches	2
Figure I-3 : Les étapes clés du développement du cœur humain et murin	3
Figure I-4 : Les quatre valves cardiaques et les trois cuspidés ou feuillets de la valve aortique.	4
Figure I-5 : Représentation de la racine de l'aorte	5
Figure I-6 : Structure trilaminaire de la valve aortique et ses composants	6
Figure I-7 : Forces hémodynamiques subies par la valve aortique.	7
Figure I-8 : Développement des valves cardiaques chez la souris.	8
Figure I-9 : Développement des bourgeons endocardiques des valves cardiaques.....	10
Figure I-10 : Facteurs de transcription et signalisation impliqués dans le développement de la valve aortique.	11
Figure I-11 : Coupe histologique de cœur de souris	12
Figure I-12 : Feuillelet d'une valve aortique en condition normale.....	15
Figure I-13 : Valve aortique normale et sténosée.....	18
Figure I-14 : Répartition mondiale de la prévalence du rétrécissement aortique.....	20
Figure I-15 : Valve aortique bicuspidée de souris	21
Figure I-16 : La voie de signalisation Notch dans le développement de la valve aortique.....	23
Figure I-17 : Développement de la SA chez la femme et l'homme.	26
Figure I-18 : Modèles de prothèse de valve aortique.	29
Figure I-19 : Etapes de la progression de la SA et les mécanismes sous-jacents.....	32
Figure I-20 : Processus moléculaires de la SA.....	36
Figure I-21 : Remodelage pathologique de la MEC valvulaire.....	40
Figure I-22 : Différenciation ostéogénique des VICs.	44
Figure I-23 : Les deux mécanismes de la minéralisation de la valve.....	47
Figure I-24 : Structure de base des canaux TRP.	53
Figure I-25 : Arbre phylogénétique des canaux de la superfamille de TRP.	54
Figure I-26 : Séquence des acides aminés de la protéine TRPM4 humaine	58
Figure I-27 : Structure du canal TRPM4 humain.....	59
Figure I-28 : Pore du canal TRPM4	60

Figure I-29 : Sites de fixation des modulateurs et quelques mutations connues du canal TRPM4.	62
Figure I-30 : Formules chimiques des molécules activant le canal TRPM4.....	63
Figure I-31 : Formules chimiques des molécules inhibant le canal TRPM4	65
Figure III-1 : Génotypage des souris $Trpm4^{-/-}$ et $Trpm4^{+/+}$	77
Figure III-2 : Images de tomographie au rayon X d'un cœur de souris	79
Figure III-3 : Recalage des images de tomographie RX sur l'atlas-IRM.....	80
Figure III-4 : Images de tomographie RX avec la segmentation de l'aorte et de la valve.	81
Figure III-5 B : Planification de l'irradiation.	82
Figure III-6 : Images d'échocardiographie de cœur de souris	84
Figure III-7 : Image d'acquisition IRM de souris	86
Figure III-8 : Coupe histologique d'une valve aortique de souris.....	87
Figure III-9 : Les différentes configurations d'enregistrement en patch-clamp.	90
Figure III-10 : Schéma représentatif d'un poste de patch-clamp	91
Figure IV-1 : Micrographie des VICs humaines en culture.	116
Figure IV-2 : Un courant cationique non-sélectif sur les VICs humaines en culture.	118
Figure IV-3 : Un courant sensible au voltage et au calcium intracellulaire	119
Figure IV-4 : Visualisation de la valve aortique des souris en IRM.....	122

Liste des tableaux

Tableau 1 : Phénotypes des cellules interstitielles valvulaires et leurs fonctions.	14
Tableau 2 : Classification de malformation de la valve aortique	21
Tableau 3 : Stades de la sténose aortique	28
Tableau 4 : Modèles de souris TRPM4 cardiaque	76
Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées en PCR.	77
Tableau 6 : Solutions utilisées en patch-clamp	91
Tableau 7 : Paramètres fonctionnels de la valve aortique des souris âgées de 12 mois.....	120
Tableau 8 : Paramètres cardiaques de souris âgées de 12 mois.	121

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	I
LISTE DES ABREVIATION	IV
TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX	VII
SOMMAIRE	IX
.....	1
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	1
A. LA VALVE AORTIQUE	1
1. Généralités sur le cœur.....	1
a) Structure et fonction	1
b) Développement du cœur	2
2. Structure et fonction de la valve aortique	3
3. Valvulogénèse.....	7
4. Composants de la valve aortique	12
a) Les cellules de la valve aortique	12
b) La matrice extracellulaire de la valve aortique.....	16
B. LA STENOSE AORTIQUE	18
1. Généralités et épidémiologie.....	18
2. Facteurs de risque de la sténose aortique	20
a) Bicuspidie aortique	20
b) Facteurs génétiques.....	23
c) Autres facteurs de risques.....	25
3. Symptômes, diagnostic, et traitements.....	27
a) Symptômes et diagnostic	27
b) Traitements	29
4. Physiopathologie.....	30
a) Lésion endothéliale.....	31
b) Inflammation de la valve aortique	33
a) Fibrose ou sclérose de la valve aortique	38
c) Minéralisation de la valve aortique.....	43

5.	Sténose aortique radio-induite	50
a)	Radiothérapie thoracique	50
b)	Valvulopathies radio-induites	51
c)	Mécanismes de la sténose radio-induite	52
C.	LE CANAL TRPM4.....	53
1.	Les Canaux TRP	53
a)	Généralités et structures	53
b)	Les canaux TRP dans le cœur	55
2.	Caractéristiques du canal TRPM4.....	56
3.	Structure du canal TRPM4.....	58
4.	Régulation du canal TRPM4.....	60
a)	Régulation physiologique	60
b)	Pharmacologie	63
5.	Rôles du canal TRPM4 dans le cœur	65
a)	Rôle physiologique	66
b)	Rôle physiopathologique	67
6.	TRPM4 et différenciation Cellulaire.....	69
II.	PROBLEMATIQUE	72
III.	MATERIELS ET METHODES.....	75
A.	MATERIELS BIOLOGIQUES	75
1.	Ethique	75
2.	Souris TRPM4 knock-out	75
3.	Génotypage des souris	77
4.	Cellules interstitielles valvulaires humaines	78
B.	IRRADIATION	78
1.	Modèle murin de la sténose aortique radio-induite.....	78
2.	Etapas de l'irradiation	78
C.	IMAGERIE CARDIAQUE	82
1.	Imagerie par ultrasons	82
a)	Principe	82
b)	Acquisition des images	83
2.	Imagerie par résonance magnétique.....	84

a)	Principe.....	84
b)	Acquisition des images.....	85
D.	MARQUAGES ET ANALYSES HISTOLOGIQUES.....	86
1.	Principe.....	86
2.	Prélèvement et Marquage.....	88
3.	Numérisation et quantification.....	88
E.	PATCH-CLAMP.....	89
1.	Principe.....	89
2.	Equipements de patch-clamp.....	90
3.	Protocole d'enregistrement.....	91
F.	ANALYSES STATISTIQUES.....	92
IV.	RESULTATS.....	94
A.	TRPM4 PARTICIPE AU REMODELAGE RADIO-INDUIT DE LA VALVE AORTIQUE CHEZ LA SOURIS.....	94
1.	Introduction.....	94
2.	Résultats.....	95
3.	Conclusion.....	95
B.	RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	116
1.	Caractérisation du canal TRPM4 dans les VICs.....	116
a)	Sélectivité ionique du canal.....	117
b)	Régulation.....	118
2.	Implication du canal TRPM4 dans la SA dégénérative.....	120
3.	Mesure de la surface de la valve aortique en IRM.....	122
V.	DISCUSSION.....	124
VI.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	130
VII.	BIBLIOGRAPHIE.....	133
VIII.	ANNEXE.....	160
	RESUME.....	166

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

A. LA VALVE AORTIQUE

1. Généralités sur le cœur

a) Structure et fonction

Le cœur est un organe musculaire creux servant de pompe qui permet l'acheminement du sang vers les différents organes. Il est constitué de quatre cavités chez les mammifères : deux oreillettes (gauche et droite) et deux ventricules (gauche et droit). Les différentes cavités communiquent entre elles à travers des orifices où sont localisés les valves cardiaques. Le cœur de mammifère possède quatre valves : deux valves atrioventriculaires (mitrale, tricuspide) qui régulent le flux sanguin entre les oreillettes et les ventricules ainsi que deux valves sigmoïdes (aortique, pulmonaire) qui régulent le flux sanguin entre les ventricules et les artères aortique et pulmonaire (Figure I-1). Les valves sigmoïdes sont ouvertes en systole et les valves atrioventriculaires en diastole.

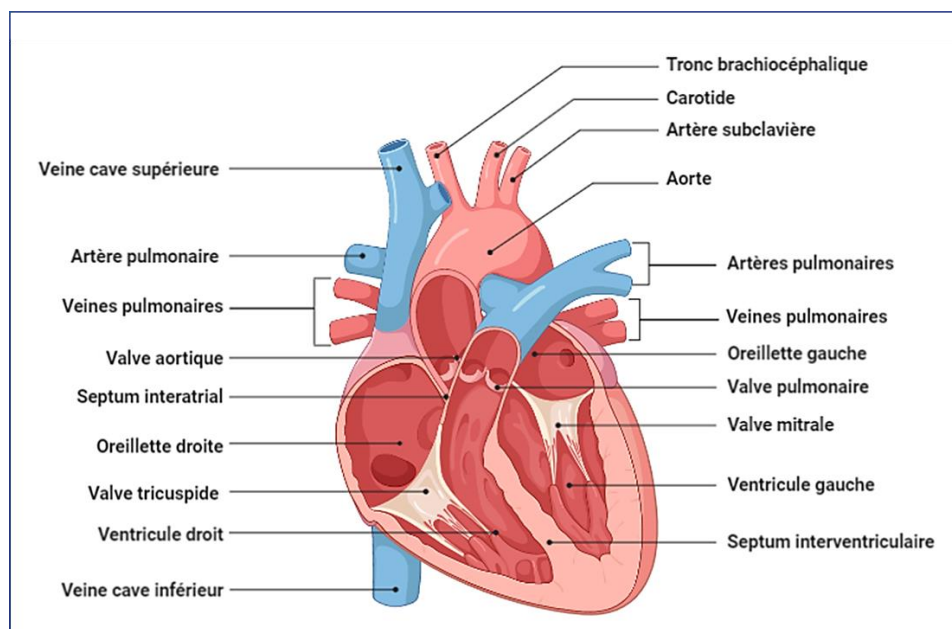


Figure I-1 : Structure anatomique du cœur humain en coupe coronale
Figure réalisée avec BioRender (<https://biorender.com/>).

Du point de vue histologique, le cœur est constitué de trois couches : le péricarde, le myocarde et l'endocarde. L'endocarde est une couche de cellules endothéliales squameuses qui tapissent l'intérieur des cavités du cœur. Le myocarde constitue le muscle strié cardiaque. Le péricarde est une enveloppe entourant le cœur. Il est composé du péricarde fibreux et du péricarde séreux séparés par l'espace péricardique. Le péricarde séreux possède deux feuillets : le feuillet viscéral ou l'épicarde enveloppant le cœur et le feuillet pariétal (Figure I-2).

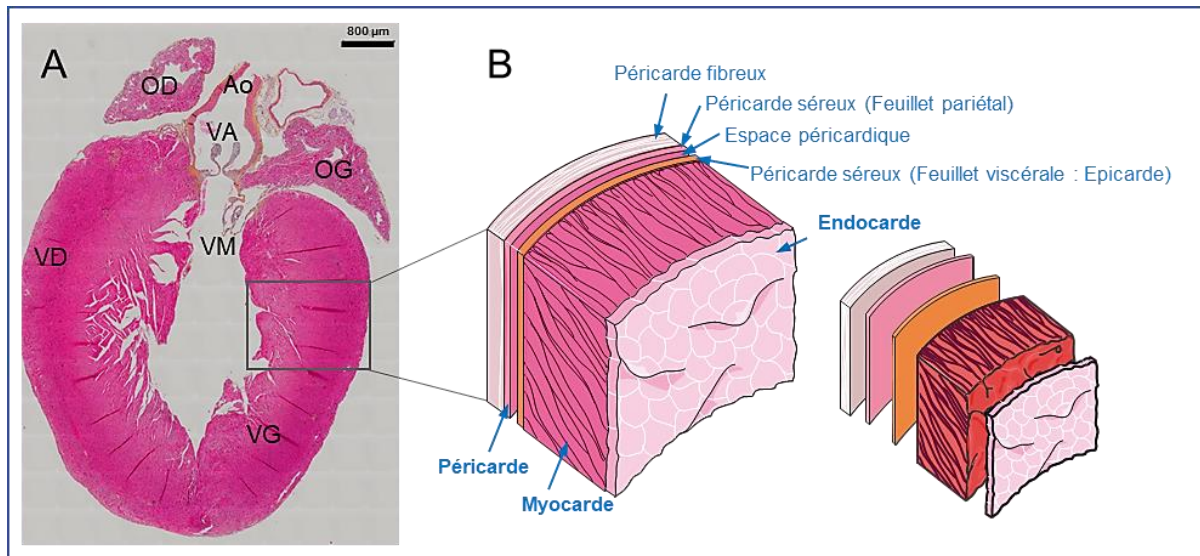


Figure I-2 : Coupe histologique du cœur et schéma de ses trois couches

A : Cœur de souris en coupe grand axe réalisée au laboratoire ; Ao : aorte, VA : valve aortique, VM : valve mitrale, OD : oreillette droite, OG : oreillette gauche, VD : ventricule droit, VG : ventricule gauche. **B** : les trois couches histologiques du cœur. Figure modifiée d'après Smart Servier Medical Art. (<https://smart.servier.com/>).

b) Développement du cœur

Le cœur est le premier organe à se former au cours de l'organogenèse humaine. Il est issu du mésoderme splanchnopleural qui se met en place durant la gastrulation. Au 15^{ème} jour du développement, nous pouvons distinguer la première structure cardiaque constituée des cellules progénitrices cardiaques spécifiées et organisées en forme de croissant. Au cours de la 3^{ème} semaine de développement, ces cellules migrent vers la ligne médiane et fusionnent pour former le tube cardiaque primitif (Figure I-3).

Ce dernier possède un revêtement interne de cellules endothéliales entouré d'une couche externe de cellules myocardiques séparées par une matrice extracellulaire (MEC) appelée gelée

cardiaque. C'est à cette période qu'apparaissent les premiers battements rythmés du cœur. Le cœur primitif se replie en formant une boucle vers la droite positionnant les oreillettes, au-dessus des ventricules, et les bourgeons endocardiques s'étendent dans la matrice extracellulaire des régions du futur canal atrioventriculaire et de la future voie d'éjection. Au cours de la 6^{ème} et 7^{ème} semaine de gestation, le cœur est compartimenté en quatre chambres distinctes et le tronc artériel commun (aussi appelé *truncus arteriosus*) dont émergent l'aorte et l'artère pulmonaire qui donnent lieu à la circulation pulmonaire et systémique (Figure I-3).

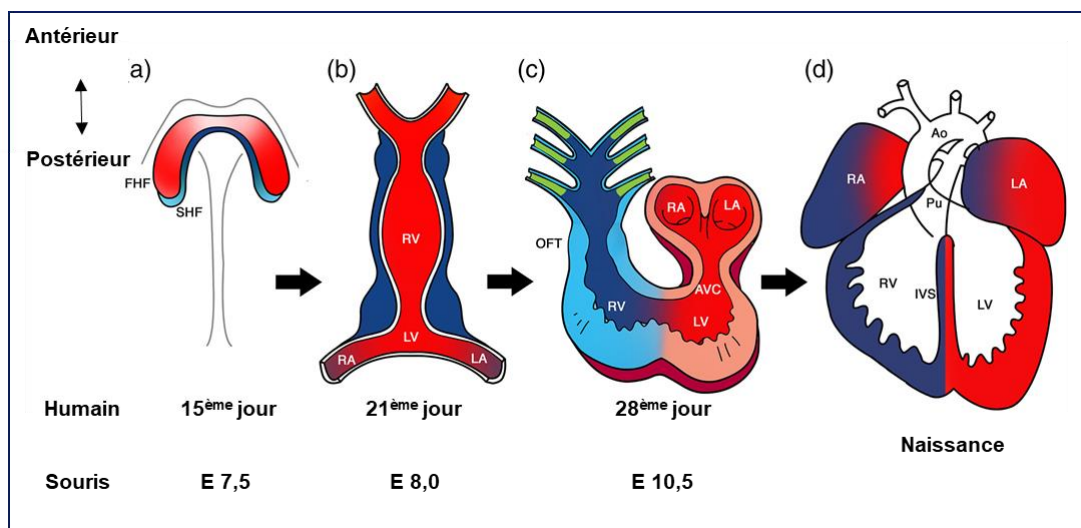


Figure I-3 : Les étapes clés du développement du cœur humain et murin.

(a) Structure en forme de croissant composée des cellules progénitrices cardiaques (CPC) : cellules du premier (rouge) et du deuxième (bleu) champ cardiaque (FHF : first heart field/SHF : second heart field) ; 15^{ème} jour de gestation (E7,5). (b) Les CPC migrent vers la ligne médiane et fusionnent pour former un tube cardiaque linéaire ; 21^{ème} jour (E8). (c) Le tube cardiaque subit une boucle vers la droite le long de l'axe antéro-postérieur, ce qui segmente le cœur en oreillettes, ventricules, canal atrioventriculaire et la voie d'éjection (OFT) ; 28^{ème} jour (E10,5). (d) Le cœur mature à quatre chambres : RA (oreillette droite), LA (oreillette gauche), RV (ventricule droit), LV (ventricule gauche). Ao : aorte, Pu : artère pulmonaire, AVC : bourgeon atrioventriculaire, IVS : septum interventriculaire. Figure modifiée d'après Madhumita *et al.* [1].

2. Structure et fonction de la valve aortique

Les quatre valves cardiaques présentent des structures similaires. La valve pulmonaire empêche le reflux sanguin de l'aorte pulmonaire vers le ventricule droit et la valve tricuspide l'empêche entre le ventricule droit et l'oreillette droite. La valve mitrale permet le flux unidirectionnel du sang de l'oreillette gauche vers le ventricule gauche. Elle a la particularité d'avoir deux feuillets contrairement aux autres valves qui en ont trois. La valve aortique est

située entre le ventricule gauche et l'aorte. Elle permet le passage unidirectionnel du flux sanguin du ventricule gauche vers l'aorte lors de la systole. Elle empêche donc la régurgitation vers le ventricule gauche en diastole. Les valves s'ouvrent et se ferment environ 3 milliards de fois au cours d'une vie. Le sujet de cette thèse porte sur la valve aortique et de ce fait nous décrirons plus en détail cette valve (Figure I-4).

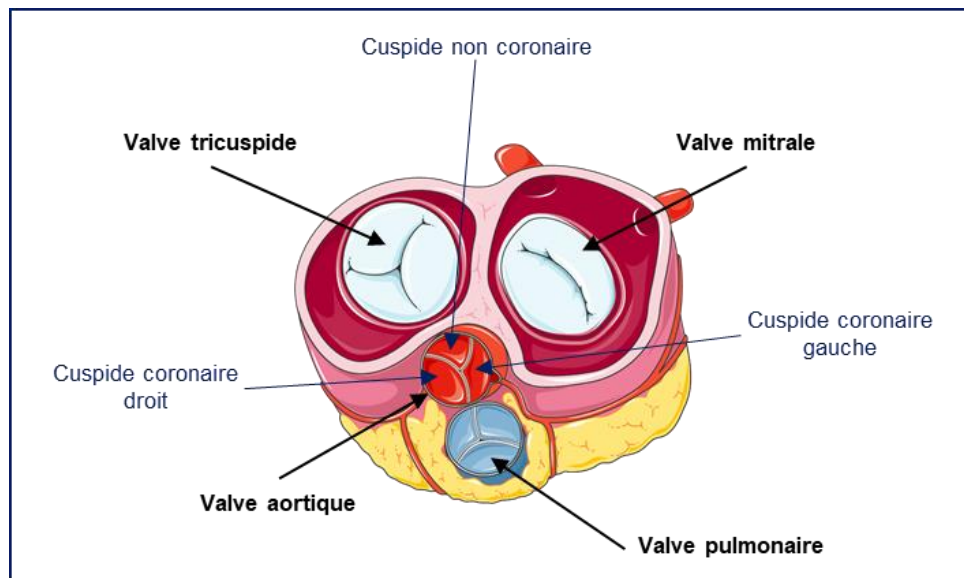


Figure I-4 : Les quatre valves cardiaques et les trois cuspidés ou feuillets de la valve aortique.
Figure modifiée d'après Smart Servier Medical Art.

La valve aortique est composée de trois cuspidés ou valvules de moins de 1mm d'épaisseur chez l'homme [2]. Ce sont des feuillets semi-lunaires fins qui sont appelés coronaire gauche, coronaire droite et non coronaire en fonction de leur emplacement par rapport à l'ostia des artères coronaires dans les sinus de Valsalva en aval de la valve (Figure I-4). A leur base, les feuillets sont attachés à l'anneau fibreux de la racine de l'aorte par une structure d'ancrage fibreuse. Les bords libres des cuspidés s'enroulent pour empêcher le flux rétrograde vers le ventricule gauche pendant la diastole lorsque la valve est fermée. La structure d'ancrage est constituée de trois branches verticales en forme de couronne qui se rejoignent au niveau des commissures des cuspidés. Les trois branches verticales définissent les triangles fibreux inter-cuspidés localisés sous les commissures. La jonction sino-tubulaire est une structure fibreuse entre le sinus de Valsalva et l'aorte ascendante où sont retenues les commissures de la valve. L'anneau aortique, composé principalement des fibres de collagène, fournit un contrefort pour la dispersion des forces (Figure I-5).

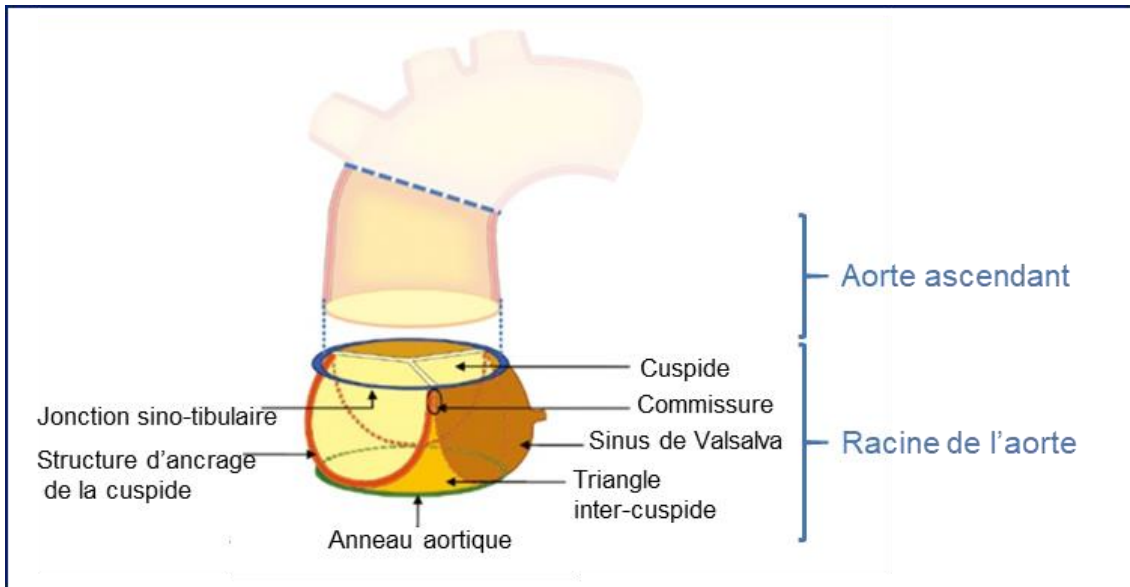


Figure I-5 : Représentation de la racine de l'aorte

Composants de la racine de l'aorte et les 3 feuillets de la valve aortique. Figure modifiée d'après Charitos *et al.* [3].

Du point de vue histologique, un feuillet valvulaire est composé de trois couches : *fibrosa*, *spongiosa* et *ventricularis*, contenant des cellules interstitielles valvulaires (VICs, *Valvular Interstitial Cell*) et entourées par une monocouche de cellules endothéliales valvulaires (VECs, *Valvular Endothelial Cell*) (Figure I-6) [4], [5]. La structure stratifiée de la valve humaine est plutôt conservée chez les vertébrés. Elle est, par exemple, similaire à celle du mouton, du lapin et de la poule [5].

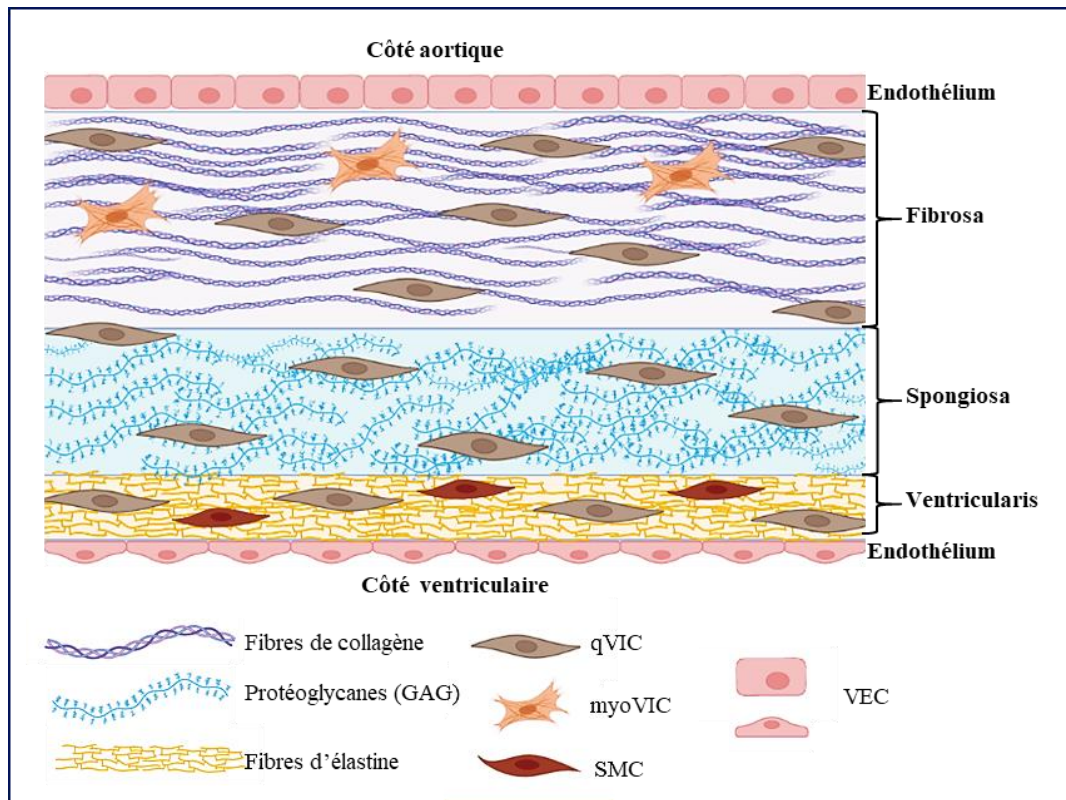


Figure I-6 : Structure trilaminéaire de la valve aortique et ses composants

Les trois couches du feuillet valvulaire : *Fibrosa* riche en collagène, *Spongiosa* riche en protéoglycanes et glycosaminoglycanes (GAG) et *Ventricularis* riche en élastine. qVIC : cellule interstitielle valvulaire quiescente, myoVICs : VICs activée ou myofibroblastique, SMC : cellule musculaire lisse, VEC : cellule endothéliale valvulaire. Figure réalisée avec BioRender.

La couche *fribrosa* est la couche externe du côté de l'aorte. Elle est composée majoritairement des fibres de collagène de type I et III orientées en circonférence (Figure I-6). Elle renforce la structure de la valve et lui donne de la flexibilité durant l'ouverture tout en favorisant la coaptation des feuillets lors de la fermeture de la valve. Elle fonctionne comme la principale couche portante responsable de la force mécanique.

La couche *spongiosa* est la couche interne riche en protéoglycanes, glycosaminoglycanes et comporte des fibres de collagène éparses (Figure I-6). Elle absorbe le stress mécanique durant le cycle cardiaque. Sa structure compressible permet la rétention d'eau tout en lubrifiant les couches adjacentes, *fibrosa* et *ventricularis*, lors de leur déformation l'une par rapport à l'autre pendant le mouvement du feuillet et la pressurisation [6].

La couche *ventricularis* est située du côté du ventricule gauche et est constituée principalement des fibres d'élastine et d'un réseau de fibres de collagène (Figure I-6) [7]. Sa

composition offre une plus grande compli-ance et permet l'apposition des bords libres des feuillets empêchant ainsi le retour du sang dans le ventricule gauche pendant la diastole. Les fibres d'élastine sont orientées radialement et semblent réduire les déformations radiales qui se produisent lorsque la valve est complètement ouverte. Elle facilite également le retour à l'état fermé [8].

La valve aortique est soumise à trois forces de base, appelées « stress », qui affectent le tissu valvulaire au cours du cycle cardiaque : la flexion, le cisaillement et la tension. La force de flexion se produit lorsque la valve s'ouvre ou se ferme activement, la force de cisaillement ou *shear stress* se produit lorsque le sang passe à travers la valve ouverte et la force de tension a lieu lors de la fermeture de la valve [6]. La face ventriculaire de la valve est soumise à de plus grandes forces de cisaillement et de vélocité de flux que la face aortique (Figure I-7).

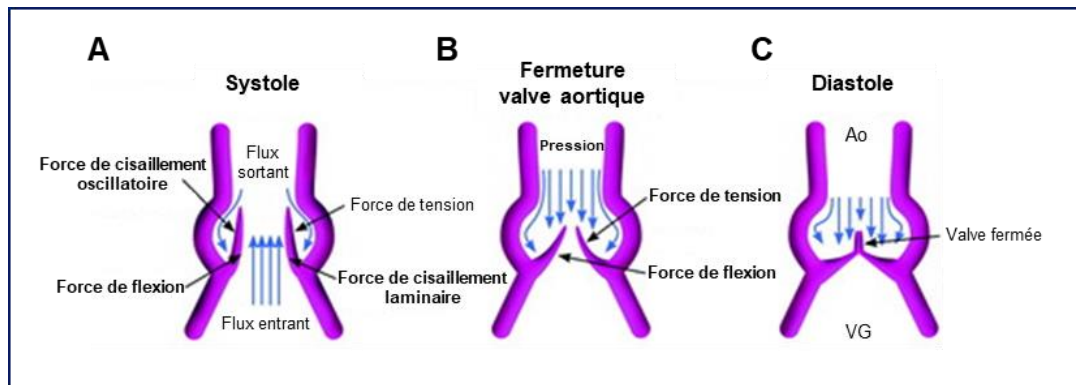


Figure I-7 : Forces hémodynamiques subies par la valve aortique.

A : en systole lors de l'ouverture. **B** : lors de la fermeture en diastole. **C** : à la fin de la diastole lorsque la valve aortique est fermée. Ao : aorte, VG : ventricule gauche. Figure modifiée d'après Rajamannan *et al.* [9].

3. Valvulogénèse

Le développement des valves cardiaques commence avec la formation des bourgeons endocardiques [10]. Ce sont des renflements de la paroi de la voie d'éjection et du canal atrioventriculaire du tube cardiaque primitif. Ces renflements sont dus à une accumulation de matrice extracellulaire entre le myocarde et l'endocarde [11].

Les bourgeons endocardiques sont formés entre le 31^{ème} et le 35^{ème} jour du développement embryonnaire chez l'homme et le 9^{ème} jour chez la souris. Le phénomène débute

avec la transition endothélio-mésenchymateuse (Figure I-8) [11]. Cette dernière est initiée par des signaux émanant des cellules endocardiques et du myocarde adjacent. Ces signaux inhibent l'expression des marqueurs endothéliaux dans le canal atrioventriculaire et la voie d'éjection tout en augmentant la synthèse des composants de la matrice extracellulaire. Les cellules endothéliales se désolidarisent les unes des autres et migrent vers la gelée cardiaque pour peupler le bourgeon endocardique de cellules mésenchymateuses (Figure I-8). Les bourgeons de la voie d'éjection formeront les valves sigmoïdes (aortique et pulmonaire) tandis que les bourgeons atrioventriculaires deviendront les valves atrioventriculaires (mitrale et tricuspide) [12]. Le développement des valves atrioventriculaires précède celui des valves sigmoïdes. La population de cellules mésenchymateuses ainsi que d'autres lignées cellulaires constituent les cellules progénitrices qui donneront naissance aux structures valvulaires matures (Figure I-8).

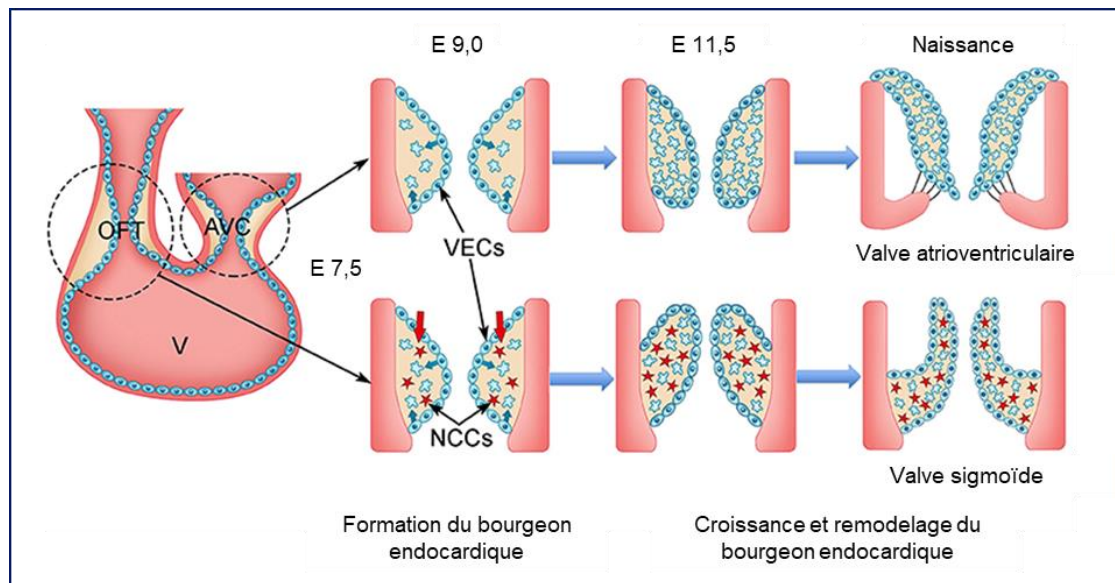


Figure I-8 : Développement des valves cardiaques chez la souris.

Plicature du tube cardiaque linéaire composé d'une couche externe, le myocarde (orange) et d'une couche interne l'endocarde (bleu) au stade E7,5. Formation des bourgeons endocardiques dans les régions du canal atrioventriculaire (AVC) et de la voie d'éjection (OFT) au stade E9,0. En réponse aux signaux du myocarde, les cellules endocardiques du AVC et de la OFT proximale subissent une transition endothélio-mésenchymateuse. Elles migrent dans la gelée cardiaque et prolifèrent pour peupler les bourgeons endocardiques tandis que les cellules de la crête neurale cardiaque (NCCs) migrent dans l'OFT distal. À E11,5, les bourgeons du AVC et de la OFT sont entièrement cellularisés. Après E11,5, croissance et remodelage des bourgeons du AVC et de la OFT par une prolifération spatio-temporelle et une apoptose des cellules interstitielles de la valve (VICs), ainsi qu'un agencement dynamique de la matrice extracellulaire. VECs : cellules endocardiques des valves, V : ventricule. Figure modifiée d'après Wang *et al.* 2021 [13].

La prolifération des cellules mésenchymateuses issues de l'endothélium entraîne une expansion des bourgeons endocardiques et l'allongement des *primordia* valvulaires. Ces derniers divisent le canal atrioventriculaire commun d'une part par la croissance des bourgeons endocardiques supérieur et inférieur et d'autre part par celle des deux bourgeons latéraux. Suite à la fusion des bourgeons supérieur et inférieur, le canal atrioventriculaire est divisé en orifices valvulaires gauche et droit (Figure I-9). En plus des cellules mésenchymateuses, les cellules de l'épicaarde peuplent les bourgeons et les feuillets pariétaux des *primordia* valvulaires. Quant aux cellules de la protubérance mésenchymateuse (dérivées du second champ cardiaque), elles participent au cloisonnement du canal atrioventriculaire [14]–[16].

Le développement des bourgeons de la voie d'éjection nécessite, en plus de la transition endothélio-mésenchymateuse précédemment décrite, l'implication d'une population de cellules de la crête neurale cardiaque. Elles migrent à travers les arcs pharyngés vers le sac aortique où elles participent au bon cloisonnement de la voie d'éjection en aorte et artère pulmonaire (Figure I-9). Les cellules de la crête neurale cardiaque contribuent également au développement des feuillets de la valve sigmoïde et de la partie supérieure du septum interventriculaire. Le développement des valves sigmoïdes est concomitant à celui de la voie d'éjection où les cellules de la crête neurale cardiaque participent à la formation des bourgeons de la voie d'éjection. Une petite éminence se développe sur chaque bourgeon pour former les cuspidés de la valve dans l'aorte et l'artère pulmonaire [12].

Les feuillets valvulaires individualisés sont visibles aux environs de la 5^{ème} et 6^{ème} semaine du développement chez le fœtus humain et vers le 13^{ème} jour du développement embryonnaire chez la souris. Les *primordia* valvulaires poursuivent leur développement par un processus de remodelage, d'amincissement et d'allongement, ainsi que le remodelage de la matrice extracellulaire. Ces processus continuent pendant une partie du développement postnatal jusqu'à ce que la valve soit correctement organisée en une structure stratifiée trilaminaire [4].

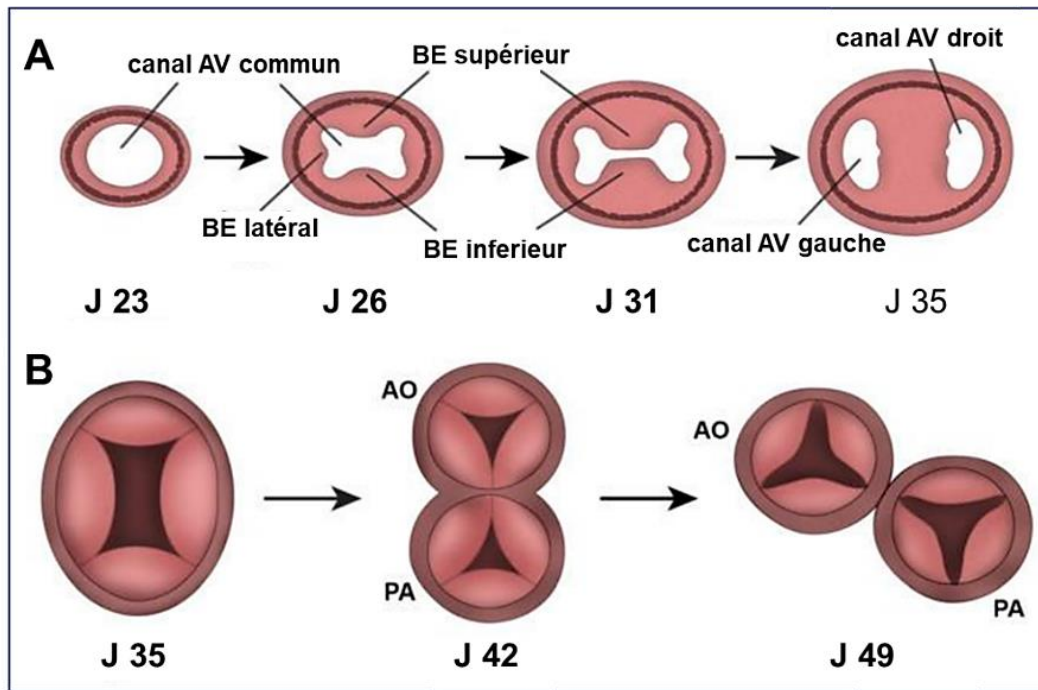


Figure I-9 : Développement des bourgeons endocardiques des valves cardiaques

A : Développement des bourgeons endocardiques (BE) atrioventriculaires (AV). **B** : Développement des BE de la voie d'éjection. PA : artère pulmonaire, Ao : aorte. J : jour de gestation. Figure modifiée d'après LaHaye *et al.* [12].

La valvulogénèse est un processus finement régulé. Le développement et la maturation de la valve sont régulés par certaines voies de signalisation impliquées dans ceux de lignés cellulaires ostéogéniques [17]. En plus de la signalisation moléculaire, l'hémodynamique environnant joue aussi un rôle important dans la formation des bourgeons endocardiques.

Les membres de la superfamille du facteur de croissance transformant (TGF- β , *Transforming Growth Factor β*) sont nécessaires à la transition endothélio-mésenchymateuse. La protéine osseuse morphogénétique 2 (BMP-2, *Bone Morphogenetic Protein 2*) sécrétée par les cellules du myocarde agit en synergie avec le TGF- β sécrété par les cellules endothéliales afin de stimuler la transition endothélio-mésenchymateuse [18], [19]. La BMP-2 agit via l'activation des facteurs de transcription SMAD1/5/8 (*small mothers against decapentaplegic*) et le TGF- β via le facteur de transcription SMAD2/3 [11]. Outre ces facteurs de croissance, les voies de signalisation Notch, Ras mais aussi Wnt (*wingless-related integration site*)/ β -caténine sont également impliquées dans le développement des bourgeons endocardiques du canal atrioventriculaire et de la voie d'éjection [12], [20]. En effet, Notch est indispensable pour le dépôt de la matrice extracellulaire et est nécessaire à la transition

endothélio-mésenchymateuse [11]. En outre, le facteur nucléaire des lymphocytes T activés cytoplasmiques 1 (NFATc1, *cytoplasmic Nuclear factor of activated T-cells 1*) et le RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) sont également nécessaires[11].

Les cellules progénitrices de la valve ont un grand pouvoir de prolifération et de migration. Au cours du développement, elles expriment différents facteurs de transcription tels que T-box 20 (Tbx20), Sox9 : SRY-box 9 (*sex-determining region Y -box 9*), Msx1/2 (*muscle segment homeobox 1/2*) et Snai1. Elles expriment également des molécules de la matrice extracellulaire (périostine, cadhérine-11, matrice métalloprotéase 2 : MMP-2) régulées par la BMP et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF, *Fibroblast Growth Factor*) (Figure I-10) [21].

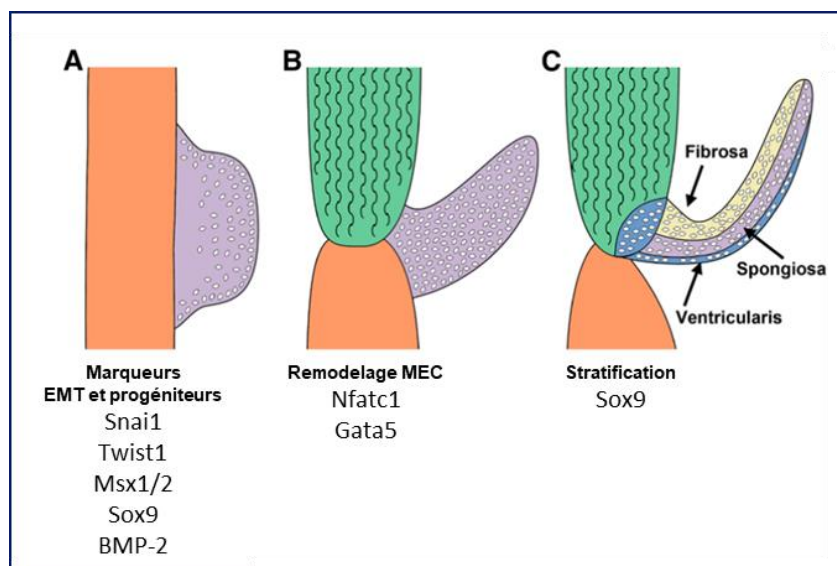


Figure I-10 : Facteurs de transcription et signalisation impliqués dans le développement de la valve aortique.

A : Formation du bourgeon endocardique (en violet). Sous l'effet de la BMP-2, l'EMT est initiée et donnent les cellules progénitrices valvulaires. Elles expriment les facteurs de transcription Snai1, Twist1, Msx1/2 et Sox9. **B** : Les bourgeons endocardiques s'allongent pour former les *primordia* valvulaires. Le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) et la morphogenèse des feuillets valvulaires dépendent de Nfatc1 et Gata5. **C** : La stratification de la MEC des *primordia* valvulaires en 3 couches (*fibrosa*, *spongiosa* et *ventricularis*) est associée à l'expression de Sox9. EMT : transition endothélio-mésenchymateuse. Figure modifiée d'après Wirrig *et al.* [22].

4. Composants de la valve aortique

a) Les cellules de la valve aortique

La valve aortique présente une monocouche des cellules endothéliales valvulaires (VECs) qui tapissent la surface des feuillets et des cellules interstitielles valvulaires (VICs) qui sont disséminées dans les 3 couches de la matrice extracellulaire du feuillet (Figure I-11).

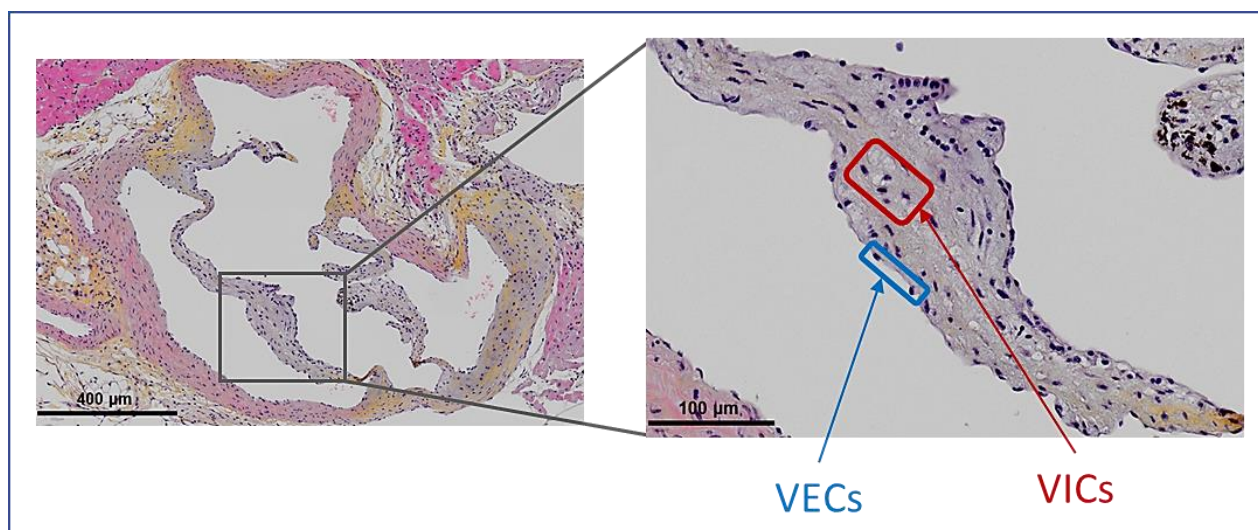


Figure I-11 : Coupe histologique de cœur de souris

Coupe transversale, VICs : cellules interstitielles valvulaires et VECs : cellules endothéliales valvulaires.

(1) Les cellules interstitielles valvulaires

Les cellules interstitielles valvulaires sont une population hétérogène comportant des fibroblastes, des cellules progénitrices mésenchymateuses, des myofibroblastes et des cellules musculaires lisses. Dans les valves sigmoïdes, les VICs ont 3 origines : les cellules progénitrices du bourgeon endocardique, les cellules de la crête neurale cardiaque et les cardiomyocytes dérivés du second champ cardiaque [23]. Les VICs présentent une morphologie allongée fusiforme. La population des VICs myofibroblastiques et des cellules musculaires lisses expriment l'alpha-actine du muscle lisse (α -SMA, *alpha Smooth Muscle Actin*) et la smootheline qui leur confèrent des propriétés contractiles [24]. Les cellules musculaires lisses sont localisées majoritairement dans la couche *ventricularis* et les cellules progénitrices mésenchymateuses dans la couche *spongiosa* [25] (Figure I-6). La fonction principale des VICs

est de maintenir l'intégrité structurale et la fonction normale de la valve en assurant le renouvellement de la matrice extracellulaire [26]. En outre, elles expriment différentes molécules d'adhésion telles que la N-cadhérine et la desmogléine, l' α - β -caténine et les connexines 26/43/45 (Tableau 1) [27].

Les cellules interstitielles valvulaires progénitrices (pVICs, *progenitor Valvular Interstitial Cells*) constituerent un pool de réserve cellulaire. Elles participeraient au renouvellement du contingent cellulaire de la valve en se différenciant en VICs quiescentes. Les pVICs ont un pouvoir de prolifération plus importante que les VICs quiescentes [28]. En plus des pVICs résidentes qui sont présentes continuellement dans la valve, nous avons aussi la présence des pVICs hématopoïétiques issues des cellules circulantes de la moelle osseuse [29]. Les pVICs hématopoïétiques peuvent se différencier en VICs activées sans passer par les qVICs [30].

Les cellules interstitielles valvulaires quiescentes (qVICs, *quiescent Valvular Interstitial Cells*) constituent la population cellulaire la plus importante de la valve aortique normale (95-98% des VICs) [8]. Elles assurent la fonction principale des VICs en sécrétant les éléments de la MEC ainsi que leur dégradation [26].

Les cellules interstitielles valvulaires activées (aVICs, *activated Valvular Interstitial Cells*) ou VICs myofibroblastiques (myoVICs) sont présentes en faible nombre dans une valve normale (5% des VICs). En condition pathologique ou de lésions valvulaire, leur population augmente et participe à la réparation tissulaire. Les qVICs peuvent s'activer en myoVICs en cas de lésions pathologiques et de stress hémodynamique ou mécanique anormaux.

En plus de ces différents types de VICs, il existe des **VICs ostéoblastiques** (obVICs) dans la valve aortique en condition pathologique. Les obVICs seront abordées dans la partie portant sur la physiopathologie de la sténose aortique (SA).

Par ailleurs, les VICs issues des valves du cœur gauche (mitrale, aortique) sont plus rigides que celles des valves du cœur droit (tricuspide, pulmonaire) suite à la forte expression de l' α -SMA et la protéine de choc thermique (HSP, *Heat Shock Protein*) [31], [32].

Types cellulaires	Localisations	Fonctions
Cellules progénitrices mésenchymateuses	Bourgeon endocardique embryonnaire	Donnent naissance aux qVICs résidentes.
PVICs	Moelle osseuse, circulation sanguine et/ou feuillets de valve cardiaque	Résidentes ou infiltrent la valve pour fournir des myoVICs et réparer le tissu de la valve.
QVICs	Feuillet de la valve aortique	Maintiennent la structure et la fonction physiologique de la valve et inhibent l'angiogenèse dans la valve.
myoVICs	Feuillet de la valve aortique	Expriment α -SMA et participent à la réparation tissulaire de la valve via la prolifération, la migration et le remodelage de la MEC. Répondent aux lésions valvulaires dues à des conditions pathologiques et à des forces mécaniques/hémodynamiques anormales.
ObVICs	Feuillet de la valve aortique	Calcification, chondrogenèse et ostéogenèse dans la valve cardiaque. Sécrètent la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine, l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse.

Tableau 1 : Phénotypes des cellules interstitielles valvulaires et leurs fonctions.

VICs : cellules interstitielles valvulaires, pVICs : VICs progénitrices, qVICs : VICs quiescentes, myoVICs : VICs activées ou myofibroblastiques. D'après Liu *et al.* [29].

(2) Les cellules endothéliales valvulaires

Les cellules endothéliales valvulaires forment une fine barrière entre la circulation sanguine et la structure sous-jacente de la valve. Elles participent indirectement à l'homéostasie de la valve et au remodelage de la MEC principalement en régulant la perméabilité de la valve [33], l'adhérence aux cellules inflammatoires [34] ainsi que la signalisation paracrine vers les VICs locales et les cellules circulantes [35]. Le signal paracrine des VECs vers les VICs se fait via le monoxyde d'azote (NO), l'endothéline-1 et le peptide natriurétique de type-C [36]–[39].

Les VECs sont orientées perpendiculairement au flux sanguin contrairement à l'endothélium vasculaire qui est orienté parallèlement. Butcher et collaborateurs ont observé que, *in vitro*, les VECs s'alignent perpendiculairement en réponse à des forces de cisaillement

hémodynamiques, tandis que les cellules endothéliales vasculaires s'alignent parallèlement à l'écoulement [40]. Ces résultats confirment ce qui est observé *in vivo*. Les VECs de l'endothélium de la face ventriculaire et celles de la face aortique sont soumises à des forces hémodynamiques différentes. Joignant la structure à la fonction, les VECs de la face ventriculaire présentent une forme allongée et une surface lisse alors que celles du côté de l'aorte ont une forme cuboïde et une surface striée [41]. En effet, les VECs bordant la couche *fibrosa* sont soumises à des forces de cisaillement oscillatoires alors que les VECs au niveau de la couche *ventricularis* sont soumises à des forces de cisaillement laminaires (Figure I-12).

En culture, les VICs humaines issues de valves saines peuvent être distinguées des VECs par un marquage positif de l' α -SMA, la vimentine et la desmine, les marqueurs les plus utilisés, ainsi que le prolyl-4-hydrolase [42]. A l'inverse, les VECs sont positives pour la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine), le CD31 et le facteur de von Willebrand contrairement aux VICs [43].

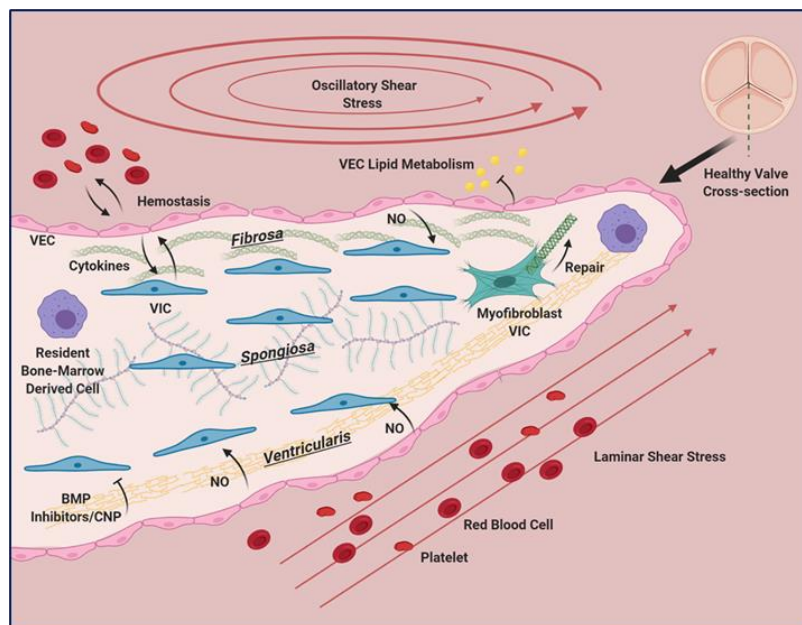


Figure I-12 : Feuillet d'une valve aortique en condition normale

La valve aortique normale avec ses trois couches (*fibrosa*, *spongiosa* et *ventricularis*). Les VICs : cellules interstitielles valvulaires (bleu) s'activent en VICs myofibroblastiques (vert) pour remodeler la matrice extracellulaire. Les cellules endothéliales valvulaires (VECs) tapissent la valve et constituent une barrière contre le sang, empêchant la coagulation, médiant l'infiltration des lipides ainsi que des nutriments et modulent l'extravasation des cellules inflammatoires. Les VECs (rose) favorisent la quiescence des VICs via Le monoxyde d'azote (NO). Les VICs et les VECs communiquent via les cytokines. Cellules immunitaires résidentes (violet). La *ventricularis* subit une force de cisaillement laminaire, tandis que la *fibrosa* est soumise à une force de cisaillement oscillatoire. D'après Driscoll *et al.* [44].

(3) Les autres types cellulaires

En plus des VICs et des VECs, d'autres types cellulaires peuplent la valve aortique. Les cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse sont présentes dans la valve [30]. Elles représentent 1 à 18% de la population cellulaire en condition normale. Elles conservent l'expression du CD45 (marqueur commun des leucocytes) et expriment aussi des marqueurs de VICs comme la vimentine [45]. En outre, les mélanocytes dérivés de la crête neurale, les cellules dendritiques, les macrophages et les mastocytes ont aussi été observés à la surface des valves matures atrioventriculaires et sigmoïdes [4].

b) La matrice extracellulaire de la valve aortique

Le collagène est la protéine structurale la plus abondante chez les mammifères. Il est composé de 3 hélices α polypeptidiques et est sécrétée par différents types cellulaires dont les fibroblastes, les cellules épithéliales, les ostéoblastes et les chondroblastes. Dans une valve aortique saine, le collagène est présent dans les trois couches mais il est plus abondant dans la couche *fibrosa* où est retrouvé le collagène de type I et III. Au niveau de la membrane basale sous endothéliale, nous avons le collagène de type II et IV [46]. Quant au collagène fibrillaire de type I, c'est la protéine majoritaire de la valve.

L'élastine est une autre protéine fibreuse de la matrice extracellulaire et confère l'élasticité aux tissus. Elle est sécrétée principalement par les fibroblastes, mais aussi par les chondroblastes et les cellules du muscle lisse. Dans une valve normale, les fibres d'élastine sont majoritairement localisées dans la couche *ventricularis* [5] mais elles sont également présentes dans la couche *spongiosa* [47]. L'élastine est organisée en fibres alignées pour assurer un soutien structurel et donner une élasticité permettant la fermeture de la valve [6].

Les protéoglycanes sont des glycoprotéines constituées d'une protéine et de glycosaminoglycane. Ils sont localisés en extracellulaire mais aussi au niveau membranaire et du côté intracellulaire. Le glycosaminoglycane est un polymère de disaccharide avec des résidus sulfate. Les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes sont présents dans les trois couches du feuillet valvulaire mais sont plus abondant dans la couche *spongiosa* [46]. Les protéoglycanes les plus abondants dans la valve aortique sont le versicane, le biglycane et la décorine alors que l'acide hyaluronique est le glycosaminoglycane le plus abondant [48]. La couche *spongiosa* est riche en protéoglycanes de type chondroïtine-sulfate qui lui confère une

structure compressible comme le cartilage [8]. De plus, le feuillet de la valve exprime également l'agrécan.

La périostine est une protéine de la matrice extracellulaire localisée dans les tissus soumis à des contraintes mécaniques constantes. La périostine est fortement exprimée au cours de la valvulogénèse après la transition endothélio-mésenchymateuse, où elle joue un rôle critique dans la fibrillogénèse du collagène I [49]. Dans les valves cardiaques postnatales normales chez l'Homme, l'expression de la périostine diminue et se localise au niveau sous-endothélial. Son expression est plus élevée dans la couche *ventricularis* que dans la couche *fibrosa* [50].

La ténascine-C est une glycoprotéine hexamérique de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important dans le développement du tissu conjonctif. Elle est exprimée dans le tissu osseux en développement et dans la plaque d'athérome. Elle est transitoirement exprimée pendant la valvulogénèse. Dans les valves saines, l'expression de ténascine-C est faible et se limite à la membrane basale [51]. Elle interagit avec d'autres composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, le collagène, la périostine, la fibrilline-2 ainsi que les protéoglycanes.

Outres les molécules de la MEC, les valves cardiaques humaines expriment différentes métalloprotéases matricielles (MMPs) et inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases matricielles (TIMPs). Les MMPs sont des protéases responsables de la dégradation des composants de la MEC. L'expression des MMPs et des TIMPs varie selon les différents types de valves. La MMP-1 est exprimée dans les quatre valves cardiaques, la MMP-2 n'est présente que dans les valves sigmoïdes alors que les MMP-3 et MMP-9 ne sont pas exprimées dans les valves cardiaques. Les TIMP-1 et TIMP-2 sont exprimées dans toutes les valves tandis que TIMP-3 n'est présent que dans les feuillets de la valve tricuspide [29]. Enfin, la valve aortique exprime des protéines d'adhésions telles que la fibronectine, la laminine, l'ostéonectine et la vitronectine [27], [46].

B. LA STENOSE AORTIQUE

1. Généralités et épidémiologie

La sténose aortique (SA) ou rétrécissement aortique est une pathologie caractérisée par un épaissement de la valve aortique conduisant à un rétrécissement progressif de l'ouverture de la valve aortique, qui est tardivement associé à une minéralisation. La conséquence finale de la SA est une insuffisance cardiaque chronique [52]. En effet, la diminution de la surface fonctionnelle de la valve en systole ainsi que sa fermeture incomplète en diastole empêchent son bon fonctionnement et ainsi l'obstruction de l'éjection du flux sanguin (Figure I-13).

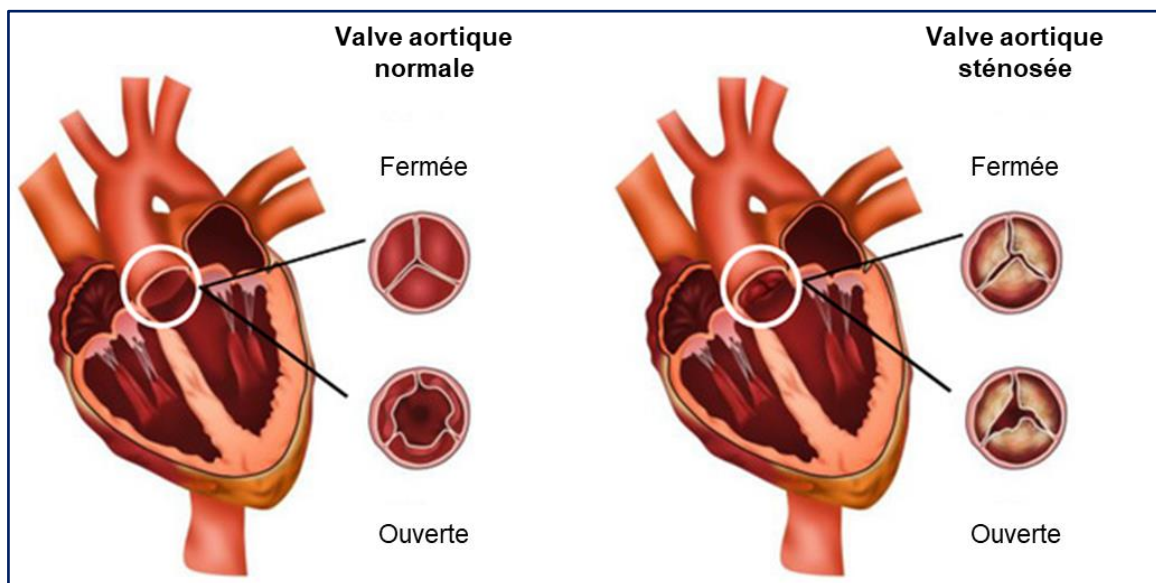


Figure I-13 : Valve aortique normale et sténosée.

Figure modifiée d'après Hanna *et al.* [53].

La SA possède trois principales étiologies : les malformations congénitales, les maladies dégénératives et les maladies infectieuses rhumatismales. La SA congénitale représente 5% des cas de la pathologie et la première cause de la maladie chez les personnes ayant moins de 65 ans [54]. Elle est due à une malformation de la valve aortique, principalement une bicuspidie. Le fait d'avoir deux cuspidés au lieu de trois (tricuspidé) entraîne des modifications hémodynamiques qui affectent l'homéostasie de la valve. Les mécanismes physiopathologiques de la SA congénitale sont les mêmes que ceux de la SA dégénérative à la différence que son apparition est précoce. La SA dégénérative, principalement la maladie de Mönckeberg, se caractérise par un remodelage des feuillets valvulaires, une sclérose et un dépôt de calcium

entraînant un dysfonctionnement de la motilité et de l'ouverture de la valve. La SA dégénérative est la forme la plus fréquente de la pathologie dans les pays occidentaux en plus d'être la cause majeure de la maladie chez les plus de 65 ans. Elle représente 82% des cas de la SA [54]. Quant à la SA post-rhumatismal, elle est due à une fièvre rhumatismale suite à une infection bactérienne. Cette dernière provoque une inflammation et la dégradation de la MEC qui entraînent la fusion des commissures de la valve aortique formant une fausse bicuspidie. La SA post-rhumatismale est la principale cause de la maladie dans les pays en voie de développement mais elle est rare dans les pays industrialisés où elle ne représente que 11% des cas [54]. En outre, d'autres étiologies de la SA existent telles que l'endocardite infectieuse et l'exposition aux rayonnements ionisants.

La SA est la plus fréquente des atteintes valvulaires (50%) et la troisième maladie cardiovasculaire dans les pays occidentaux après les coronaropathies et l'hypertension artérielle systémique [55]. Elle atteint principalement les personnes âgées avec une prévalence de 25 % de sclérose et 2% de sténose aortique chez les plus de 65 ans. Cette prévalence augmente avec l'âge et atteint 2,8% et 4% dans la population âgée de plus de 75 ans et 85 ans, respectivement [56]–[58]. Ces chiffres prédisent que la prévalence de la SA est appelée à augmenter dans les années à venir avec le vieillissement de la population ; ce qui en fait un problème majeur de santé publique. D'où l'importance d'étudier cette pathologie afin de mieux la connaître et la prévenir.

Une étude de Yadgir et collaborateurs a analysé les données épidémiologiques des valvulopathies dans 195 pays. Les auteurs ont montré une forte progression des cas de SA ainsi qu'une augmentation de 101% de l'espérance de vie corrigée de l'incapacité (DALY, *Disability-adjusted life year*), autrement dit l'espérance de vie en bonne santé, entre 1990 et 2017. Ils ont rapporté 12,6 millions de nouveaux cas de la SA en 2017 dans le monde et 18,1 millions de nouveaux cas de la maladie dégénérative de la valve mitrale. De plus, la SA a causé 102700 décès à travers le monde en 2017. Ils ont également observé une disparité importante de la mortalité et de la prévalence en fonction des zones géographiques (Figure I-14) [59]. Dans une autre étude de 2019 regroupant 7247 patients en Europe et en Afrique du Nord, la SA représentait 41,2% des 5219 cas de valvulopathies contre 5,3 % de régurgitation de la valve aortique, 21,3% de régurgitation de la valve mitrale et 4,5% de sténose mitrale. En outre, 79,4% des patients avec une SA symptomatique avaient subi une intervention chirurgicale [60].

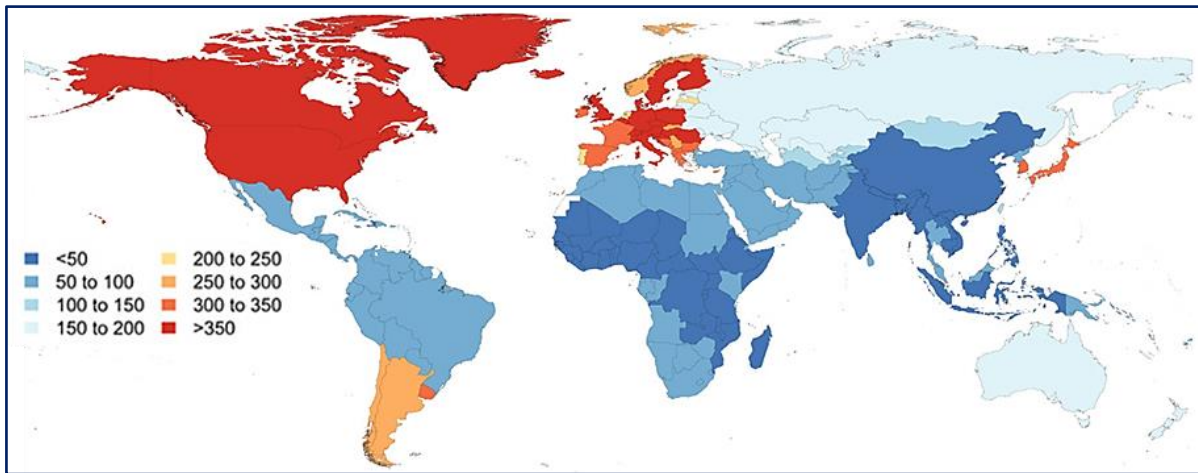


Figure I-14 : Répartition mondiale de la prévalence du rétrécissement aortique

Prévalences standardisées par rapport à l'âge de la sténose aortique en 2017 (cas pour 100 000 personnes). Modifiée d'après Yadgir *et al.* [59].

2. Facteurs de risque de la sténose aortique

Plusieurs facteurs de risque prédisposent au développement de la SA. Entre autres, nous retrouvons des facteurs comme les malformations congénitales dont la plus importante est la bicuspidie aortique, les anomalies génétiques et les facteurs acquis dont certains sont communs aux maladies cardiovasculaires. Dans un premier temps, nous présenterons de manière synthétique la bicuspidie aortique étant donné qu'elle est la principale malformation congénitale. Puis, nous aborderons les différents facteurs génétiques impliqués dans la pathogénicité ainsi que les autres facteurs connus.

a) Bicuspidie aortique

La bicuspidie aortique est une malformation congénitale de la valve aortique où la valve présente deux feuillets au lieu de trois (Figure I-15). Elle est l'atteinte la plus fréquente de la valve aortique et affecte 1 à 2% de la population [61]. Elle est due à une anomalie au cours des différentes étapes de la valvulogénèse. D'une part, une altération de la transition endothélio-mésenchymateuse et de la migration des cellules de la crête neurale cardiaque pendant la formation du bourgeon endocardique. D'autre part, une altération de la septation de la voie d'éjection et de l'excavation du bourgeon endocardique valvulaire (Figure I-15) [62]. Ces dysfonctionnements conduisent au développement de deux *primordia* des feuillets valvulaires au lieu de trois. La bicuspidie aortique est la deuxième cause de la SA (Tableau 2).

Les patients ayant une valve aortique bicuspidie présentent un profil hémodynamique différent de celui observé avec la valve aortique tricuspide [63]. Ils ont une forte tendance à développer la SA dès l'âge de 20 à 30 ans [57], [64]. La moitié des patients ayant une SA nécessitant un remplacement de la valve ont une valve aortique bicuspidie [65], [66].



Figure I-15 : Valve aortique bicuspidie de souris
Coloration à l'hématoxyline éosine safran d'une valve de souris en coupe transversale.

Tricuspidie	Quadricuspidie	Bicuspidie		
		Type 0 (7%)	Type 1 (88%)	Type 2 (5%)
		<p>Orientation latérale 4%</p>	<p>Fusion cuspides gauche/droit 71%</p> <p>Fusion cuspides gauche/non coronarien 3%</p> <p>Fusion cuspides droit/non coronarien 15%</p>	<p>Unicuspidie</p> <p>Fusion cuspides gauche/droit et droit/non coronarien 5%</p>

Tableau 2 : Classification de malformation de la valve aortique

Différents types de bicuspidie et leurs prévalences. Raphé en bleu et commissure en blanc. D : cuspidie coronaire droit, G : cuspidie coronaire gauche et NC : cuspidie non coronaire. Tableau réalisé d'après Sievers *et al.* [67].

La bicuspidie aortique est une maladie héréditaire liée à la mutation de plusieurs gènes, particulièrement *NOTCH1*. Une étude a montré le rôle important de Notch1 dans la valvulogénèse. En effet, la surexpression transitoire de Notch1 provoque un épaissement des valves cardiaques chez l'embryon du poisson-zèbre, tandis que l'inhibition de cette voie de signalisation interrompt la valvulogénèse suite à la diminution de la transition endothélio-mésenchymateuse nécessaire à la formation de la valve (Figure I-16) [68]. Dans une autre étude, Garg et collaborateurs ont identifié une mutation autosomique dominante de *NOTCH1* par une analyse de liaison génétique (*Genetic linkage analysis*) des valves aortiques bicuspidées calcifiées dans des familles non syndromiques [69]. D'autres mutations de *NOTCH1* ont été identifiées, non seulement dans des cas de valves aortiques bicuspidées familiales, mais aussi dans 4 % des cas sporadiques [70].

En plus de *NOTCH1*, d'autres gènes sont impliqués dans le développement de la bicuspidie notamment les mutations des gènes de l'oxyde nitrique synthase endothélial (*eNOS*), du facteur de transcription *GATA5* et de la *FIBRILINE1*. L'eNOS participe au développement de la valve et des vaisseaux, mais son expression est faible chez les patients atteints de bicuspidie aortique [71]. Le facteur de transcription GATA-5 régule également le développement de la valve aortique, comme le montre sa délétion chez la souris qui entraîne la formation de valves aortiques bicuspidées [72].

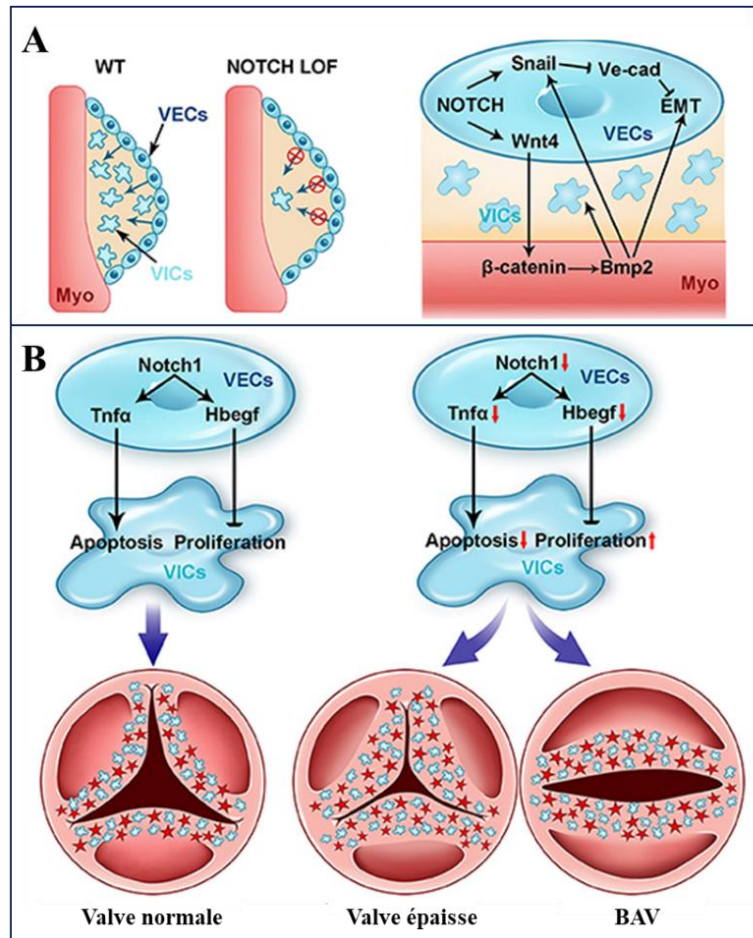


Figure I-16 : La voie de signalisation Notch dans le développement de la valve aortique.

A : Notch est essentiel à transition endothélio-mésenchymateuse (EMT) (flèches bleues). La perte de fonction de Notch (NOTCH LOF) inhibe l'EMT chez les souris LOF. **B** : Notch contrôle le remodelage des valves cardiaques en régulant l'apoptose et la prolifération. Dans les cellules endocardiques de la valve (VECs), il favorise l'expression du facteur de nécrose tumorale (Tnfa) qui induit ensuite l'apoptose des cellules interstitielles valvulaires (VICs) et en parallèle, il active l'expression de Hbegf, qui inhibe ensuite la prolifération. Le dysfonctionnement de NOTCH entraîne une diminution de l'expression de Tnfa et de Hbegf, ce qui conduit à l'épaississement des feuillets valvulaires et à la bicuspidie aortique. Figure modifiée d'après Wang *et al.* [13].

b) Facteurs génétiques

Plusieurs facteurs génétiques sont impliqués dans la pathogénicité de la SA. Ces facteurs sont les gènes qui régulent le développement de la valve et causent les malformations, ainsi que les gènes qui participent à la structure et la fonction de la valve aortique.

C'est le cas du gène *NOTCH1* précédemment cité dont la mutation conduit à la bicuspidie. Les mutations de *NOTCH1* sont des facteurs de risque de la SA, de même que les mutations des gènes de la MEC tels que le *COLLAGENE1A1* et l'*ELASTINE* [73]. Notamment

une mutation du gène *ELASTINE* à l'origine du syndrome de Williams est un facteur prédictif de la SA [74]. Les syndromes de Ehlers–Danlos et l'ostéogenèse imparfaite causés entre autres par des mutations sur le gène *COLLAGENE1A1* sont également des facteurs de risque de la SA [75], [76].

Les mutations des gènes du métabolisme des lipides et du calcium sont aussi prédictives de la SA. Le gène de la lipoprotéine (a) (*LPA*) serait un facteur de risque de la SA. En effet, des études d'association pangénomique (GWAS, *genome-wide association study*) ont démontré qu'une mutation génétique sur le locus de *LPA*, qui se traduit par une augmentation du niveau d'expression de la Lp(a), est impliquée dans la SA. De même, le gène codant la palmdelphin (*PALMD*), qui favorise la différenciation des myoblastes et la régénération musculaire [77], a été identifié par une étude d'association pantranscriptomique (TWAS, *transcriptome-wide association study*) comme étant un gène important dans la SA. En effet, la baisse des niveaux d'expression de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de *PALMD* dans la valve aortique est associée au risque de développer une SA [78]. Par ailleurs, dans une étude utilisant les deux précédentes techniques (GWAS et TWAS) ; Thériault et collaborateurs ont identifié d'autres gènes impliqués dans la SA : interleukine 6 (*IL-6*), phosphatase alcaline (*ALPL*, *alkaline phosphatase*) et *neuron navigator 1* (*NAVI*). Ces gènes participent également au processus de minéralisation de la valve aortique qui sera abordé plus tard.

En plus de l'implication de certains gènes dans la physiopathologie de la SA, les facteurs épigénétiques sont également impliqués dans le développement de la SA tels que les ARN non codant (ncRNA, *non-coding RiboNuclic Acid*) et la méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN).

Plusieurs ncRNA participeraient à la régulation de la SA parmi lesquels les micro ARN (miRNA) qui sont des ncRNA de 18 à 25 nucléotides et les longs ARN non codants (lncRNA, *long non-coding RiboNuclic Acid*) qui ont plus de 200 nucléotides. Ils participent à plusieurs processus cellulaires dont le développement cellulaire, la prolifération, le métabolisme lipidique et l'angiogenèse [79]. Les ncRNA régulent l'expression post transcriptionnelle des gènes soit en réprimant la traduction par fixation sur l'extrémité 3'-UTR, soit en dégradant le transcrit. Une étude a démontré que le lncRNA HOTAIR (*HOX transcript antisense RNA*) joue un rôle dans la calcification de la valve aortique [80].

Les miRNA peuvent activer des voies pro-inflammatoires et certains sont des stimulateurs ou inhibiteurs de la calcification des cellules interstitielles valvulaires humaines, deux processus clés de la SA qui seront abordés plus tard [81]. Zhang et collaborateurs ont démontré qu'en réponse à la BMP-2, le miRNA-30b régule négativement la calcification précoce des VICs en supprimant Runx2 (*runt-related transcription factor 2*), le SMAD1 et la caspase-3 [82]. De même, le miRNA-204 réprime la calcification en inhibant l'expression de Runx2 ; ce qui empêche la différenciation ostéoblastique des VICs. De plus, le miRNA-638 et le miRNA-138 empêchent la calcification des VICs en inhibant leur différenciation en ostéoblastes [83], [84]. Le miRNA-14, pour sa part, inhibe la formation des nodules de calcification, l'activité de l'ALP, l'expression de Runx2 et de BMP-2 induite par le TGF- β 1 dans les VICs porcines [85]. Toutefois, le miRNA-29b serait un promoteur de la calcification valvulaire via les voies TGF- β 3/SMAD3 et Wnt3/ β -caténine [86]. De même que le miRNA-214 qui accélère la réaction inflammatoire par la voie de signalisation MyD88/ *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) [87].

L'autre mécanisme épigénétique, qui jouerait un rôle dans la différenciation ostéogénique des VICs aortiques et donc la SA, est l'altération de la méthylation de l'ADN. Hadji et collaborateurs ont démontré que l'altération de la méthylation de l'ADN du promoteur du lncRNA H19 dans la SA est associée à une surexpression de ce lncRNA. Cette surexpression favorise la minéralisation en réduisant l'expression de Notch [88]. De plus, l'hypométhylation de la 5-lipoxygénase est associée à la SA. Cette dernière est impliquée dans la synthèse des leucotriènes qui favorisent l'inflammation. Les VICs humaines des valves calcifiées présentent une hypométhylation sur le site du promoteur de la 5-lipoxygénase et, par conséquent, une augmentation de l'expression de son ARNm. Ce qui contribuerait à l'inflammation [89].

c) Autres facteurs de risques

En plus des facteurs génétiques, plusieurs facteurs de risque sont liés au développement de la SA : le genre masculin, le vieillissement, le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, la dyslipidémie et le diabète *mellitus* [52]. A ces facteurs s'ajoute le taux plasmatique élevé de triglycéride, de calcium ou de créatine [52].

Le vieillissement, l'un facteur de risque connu de la SA, est associé à une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote qui entraîne une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Il est également associé à une diminution de la prolifération des VECs en plus d'une perméabilité accrue de la paroi des cellules endothéliales. Les VECs changent de taille et de forme avec le vieillissement et expriment des profils moléculaires distincts [90].

Aggarwal et collaborateurs ont montré que le genre masculin est positivement corrélé à une incidence plus élevée de la SA et des niveaux de calcification plus élevés comparé au genre féminin [91]. L'analyse transcriptomique des VICs porcines a également révélé des différences entre les mâles et les femelles. En effet, les VICs issues des mâles présentent plus d'inflammation, de dépôt de lipides et une plus forte expression de facteurs angiogéniques ainsi qu'un taux de prolifération et d'apoptose cellulaire plus importante comparé à celles issues des femelles [92]. Le développement de la maladie semble différent selon le sexe. Ainsi, pour une même sévérité de SA, celle-ci se caractérise chez la femme par une fibrose importante et une faible calcification et inversement chez l'homme par une importante calcification et moins de fibrose (Figure I-17) [93], [94].

L'hypertension, quant à elle, entraîne une hémodynamique anormale à l'origine de la pathologie. Certains mécanismes liés aux facteurs de risque seront discutés plus en détail dans la partie physiopathologie de la valve notamment celui concernant le métabolisme des lipides.

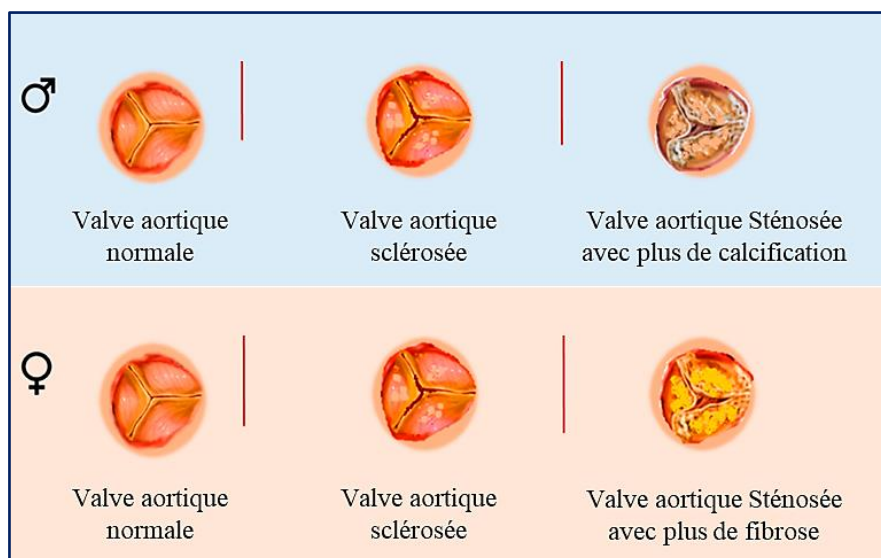


Figure I-17 : Développement de la SA chez la femme et l'homme.

Les femmes présentent une SA avec une prévalence de la fibrose et les hommes une SA avec la prévalence de la calcification. SA : sténose aortique. Figure modifiée d'après Summerhill *et al.* [94].

3. Symptômes, diagnostic, et traitements

a) Symptômes et diagnostic

La sténose aortique est souvent asymptomatique au cours des premiers stades. Les symptômes ne se manifestent que lorsque les patients atteignent le stade sévère de la pathologie. Les symptômes fréquents de la SA sont une dyspnée, une angine de poitrine ou angor et une syncope.

L'échographie est la technique par excellence pour évaluer le dysfonctionnement de la valve aortique et ses conséquences sur le ventricule gauche. L'IRM peut fournir des informations complémentaires ; notamment sur la fibrose du myocarde. L'échocardiographie transthoracique apporte des informations sur l'anatomie de la valve et les paramètres du flux sanguin ainsi que la présence de la calcification. Très souvent une échocardiographie est prescrite à la suite des murmures systolique et/ou d'autres symptômes lors de l'auscultation. Chez certains patients, la SA peut être diagnostiquée lors d'une échographie prescrite pour une autre pathologie. La majorité des patients diagnostiqués sont asymptomatiques et sont suivis jusqu'au remplacement de la valve. Cependant, une faible proportion des patients est diagnostiquée tardivement avec l'apparition des complications telles que les symptômes de l'insuffisance cardiaque.

L'échocardiographie Doppler est utilisée pour déterminer la sévérité de la pathologie en mesurant les vitesses du flux sanguin, les gradients de pression transvalvulaires (ΔP), l'aire valvulaire aortique (AVA) ainsi que l'AVA indexée à la surface corporelle. D'autres techniques telles que l'échocardiographie transoesophagienne, le cathétérisme cardiaque, l'angiographie coronarienne, la tomographie par ordinateur et l'IRM peuvent être utilisées en complément pour confirmer le diagnostic. Ainsi, la SA intervient lorsque la surface valvulaire est inférieure à 1,5 cm² et une SA sévère lorsque cette surface est inférieure à 1 cm² au lieu de 3 à 4 cm² pour une valve normale, ainsi qu'un gradient de pression moyen supérieur à 40 mmHg (Tableau 3) [95]. Selon la sévérité de la pathologie, les patients peuvent être classés dans l'un des quatre stades de la SA suivants :

- Stade A : risque de SA, caractérisé par une sclérose aortique ou une bicuspidie
- Stade B : caractérisé par une progression légère à modérée de la SA
- Stade C : SA sévère asymptomatique
- Stade D : SA sévère symptomatique.

Critères de sévérité	Sclérose aortique	Légère	Modérée	Sévère
V _{max} (m/s)	< 2	2 – 3	3 – 4	≥ 4
ΔP _{moy} (mmHg)	< 10	10 – 19	20 – 39	≥ 40
AVA (cm ²)	> 2,0	1,6 – 2,0	1,1 – 1,5	≤ 1,0
AVA indexée	> 1,2	1,0 – 1,2	0,7 – 0,9	≤ 0,6

Tableau 3 : Stades de la sténose aortique

V_{max} : vitesse transvalvulaire maximale, ΔP_{moy} : gradient de pression transvalvulaire moyen, AVA : aire valvulaire aortique, AVA indexée : AVA indexée à la surface corporelle. Tableau modifiée d'après Lindman *et al.* [52].

Pour identifier la présence et le stade de la SA, l'évaluation des différents paramètres est nécessaire. Aux principaux paramètres cités ci-dessus s'ajoutent l'état fonctionnel, le volume systolique, l'indice de vitesse Doppler (VEi), le degré de calcification valvulaire, la fonction du ventriculaire gauche, la présence ou non d'hypertrophie du ventriculaire gauche. Selon les dernières recommandations de la société européenne de cardiologie et l'association européenne pour la chirurgie cardiothoracique de 2021, quatre catégories de SA sévères peuvent être définies en se basant sur les résultats des investigations précédentes [96] :

- Sténose aortique à gradient élevé [$\Delta P \geq 40$ mmHg, $V_{max} \geq 4,0$ m/s, $AVA \leq 1$ cm² (ou $\leq 0,6$ cm²/m²)].
- Sténose aortique à faible débit et à faible gradient avec fraction d'éjection (FEVG) réduite ($\Delta P < 40$ mmHg, $AVA \leq 1$ cm², $FEVG < 50\%$, $VEi \leq 35$ mL/m²).
- Sténose aortique à faible débit et à faible gradient avec fraction d'éjection préservée ($\Delta P < 40$ mmHg, $AVA \leq 1$ cm², $FEVG \geq 50\%$, $VEi \leq 35$ mL/m²).
- Sténose aortique à flux normal et à faible gradient avec fraction d'éjection préservée ($\Delta P < 40$ mmHg, $AVA \leq 1$ cm², $FEVG \geq 50\%$, $VEi > 35$ mL/m²).

b) Traitements

Actuellement, il n'existe aucun traitement médicamenteux de la SA. Le seul traitement disponible est le remplacement de la valve aortique (RVA) par une prothèse mécanique ou une bioprothèse (Figure I-18). Le RVA se fait soit par thoracotomie, soit par voie percutanée (TAVI, *Transcatheter Aortic Valve Implantation*). En absence de remplacement de la valve, le taux de mortalité est de 37% un an après l'apparition des symptômes [97]. Etant une maladie qui touche majoritairement les personnes âgées présentant d'autres comorbidités en plus de la SA ; le TAVI s'est avéré être un traitement de choix pour les patients avec des contre-indications à la chirurgie.

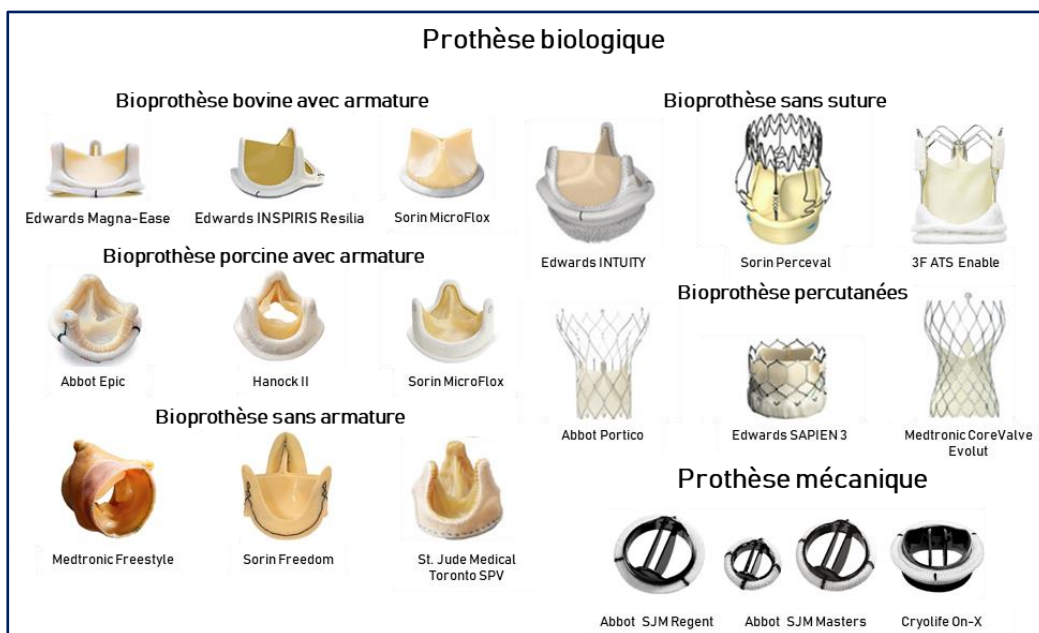


Figure I-18 : Modèles de prothèse de valve aortique.

Figure modifiée d'après Freitas-Ferraz *et al.* et Kwon *et al.* [98], [99]

Plusieurs molécules thérapeutiques ciblant les voies de signalisation et les acteurs impliqués dans la physiopathologie de la SA font ou ont fait l'objet d'essais cliniques. Certaines sont déjà utilisées dans le traitement d'autres pathologies notamment pour le traitement des atteintes vasculaires dont l'athérosclérose. Ces molécules ont donné des résultats satisfaisants en préclinique, cependant ceux obtenus en clinique ne sont pas concluants. L'un des exemples est l'utilisation des statines dans le traitement de la SA. Les statines représentent un groupe de médicaments utilisé pour le traitement de l'hypercholestérolémie dans les maladies cardiovasculaires. Ce sont des inhibiteurs de l'Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A réductase

(HMG-CoA réductase), une enzyme du métabolisme du cholestérol. D'après l'hypothèse émise, les statines ralentiraient la progression de la SA en diminuant le taux des lipides. Ces derniers jouent un rôle important dans la physiopathologie de la SA. Bien que les statines soient un traitement efficace pour les patients avec des plaques d'athéromes, elles ne peuvent pas ralentir la progression de la pathologie [100]–[102]. Les investigations sur des potentiels médicaments inhibant différentes voies de signalisation sont en cours : les voies de signalisation BMP/TGF- β , Wnt/ β -caténine, eNOS, Notch, RANKL et le système rénine-angiotensine.

4. Physiopathologie

Longtemps considéré comme un processus passif et une pathologie dégénérative de la valve, la SA est en réalité une pathologie active caractérisée par une inflammation qui conduit à un épaissement fibreux des feuillets de la valve aortique et au final à une calcification de la valve. Le remodelage fibreux et la minéralisation empêchent la diffusion passive des nutriments et de l'oxygène à travers la valve d'où la mise en place d'une néoangiogenèse. Ainsi, les processus physiopathologiques de la SA sont l'inflammation, la fibrose ou sclérose et la calcification aboutissant à la sténose de la valve (Figure I-19).

Le point de départ de la SA est une lésion endothéliale entraînant une activation de l'endothélium valvulaire via la surexpression des molécules d'adhésion. Elle est suivie du recrutement des cellules immunitaires, du dépôt de lipides et de la mise en place d'une réaction inflammatoire. Ensuite, une fibrose caractérisée par un remodelage de la matrice extracellulaire a lieu et elle aboutit à une valve aortique sclérosée [7], [103]. C'est le stade précoce de la maladie qui est souvent asymptomatique. De plus, l'initiation de la pathologie implique l'activation des VICs.

Le stade final de la pathologie, appelé la SA calcifiée, se caractérise par des larges nodules calcifiés à la surface du feuillet qui font saillie dans le sinus de Valsalva gênant ainsi la motilité du feuillet [9]. Les lésions et la calcification interviennent préférentiellement au niveau de la couche *fibrosa* du feuillet valvulaire [2]. En outre, les voies de signalisation impliquées dans la valvulogenèse et l'ostéogenèse, telles que Wnt, TGF- β 1, BMP et Notch sont également impliquées dans l'apparition de la SA. Les différents processus et acteurs de la

physiopathologie de la SA étant étroitement liés, nous avons décidé de les présenter en fonction des principaux processus de la pathologie.

a) Lésion endothéliale

L'élément déclencheur de la SA est une lésion endothéliale telle qu'observée dans l'athérosclérose. Cette lésion résulte de l'exposition aux différents facteurs de risque tels que l'étirement cyclique de la valve et les forces hémodynamiques extrêmes comme la diminution des forces de cisaillement. En condition physiologique, les forces de cisaillement du flux sanguin contribuent à l'homéostasie valvulaire. Cependant, une modification de ces forces entraîne une lésion endothéliale et la surexpression de la VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*), l'ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule*) et la sélectine endothéliale (E-selectine) [104], [105]. Ceci permet l'infiltration des lipides, particulièrement les lipoprotéines de basse densité (*LDL, Low Density Lipoprotein*) et la lipoprotéine (a), ainsi que le recrutement des cellules inflammatoires dans le feuillet valvulaire (Figure I-20). Par la suite, des foyers de lésion sous-endothéliaux (sous forme de plaque) sont mis en place avec différents acteurs cellulaires qui interagissent. De plus, les VECs produisent des ROS qui oxydent les LDL [58]. L'expansion de ce processus inflammatoire aboutit à une activation des VICs. Le remodelage de la matrice extracellulaire qui en résulte, en plus de la rigidification des feuillets et le dysfonctionnement valvulaire, provoque un stress mécanique supplémentaire qui entretient la boucle auto-entretenu du dysfonctionnement endothélial [58].

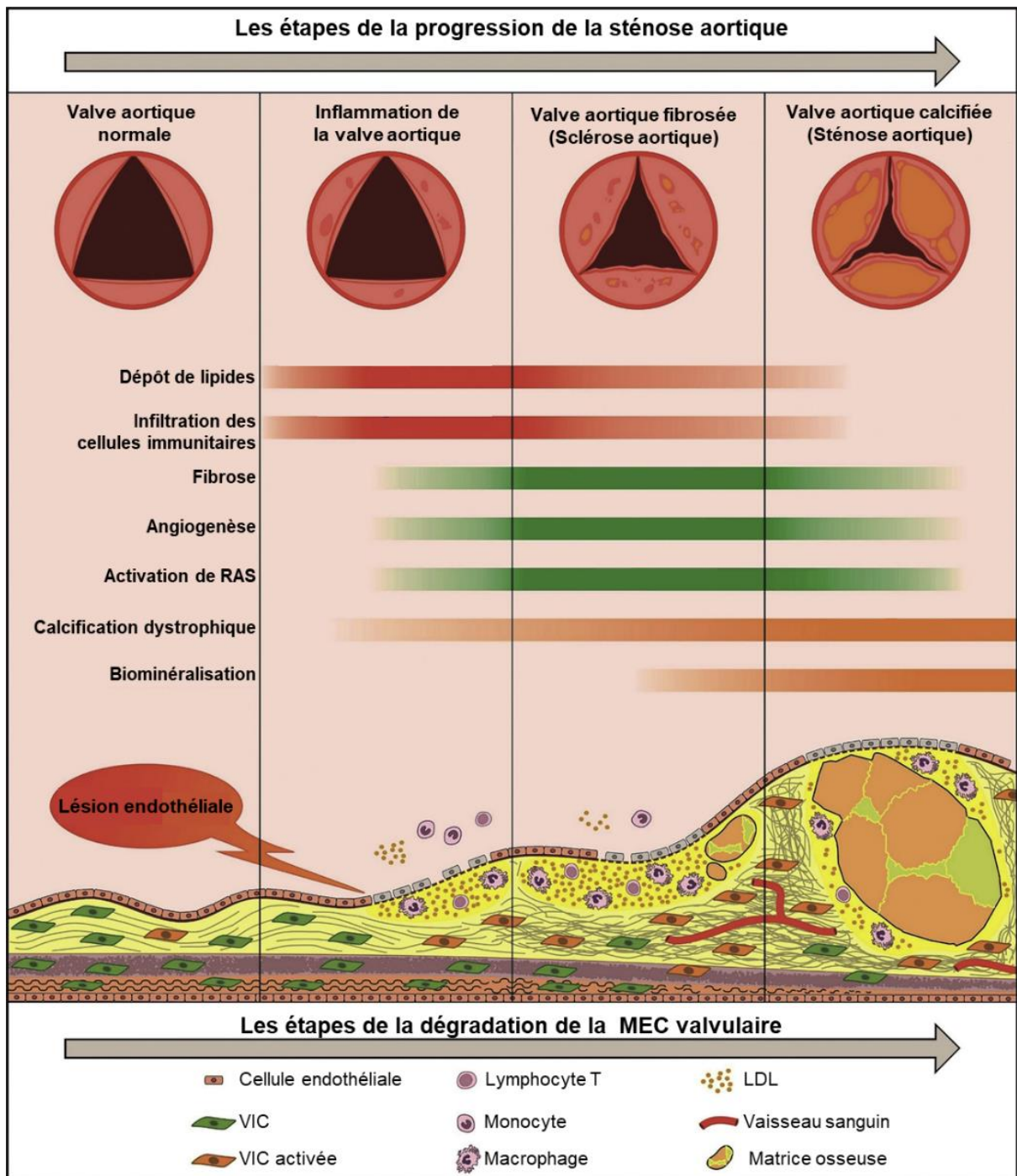


Figure I-19 : Etapes de la progression de la SA et les mécanismes sous-jacents.
 RAS : système rénine-angiotensine. Figure modifiée d'après Kostyunin *et al.* [106].

b) Inflammation de la valve aortique

La SA peut être considérée comme une maladie inflammatoire tout comme l'athérosclérose. Cette inflammation est le plus souvent stérile. C'est la principale réponse de l'immunité innée qui survient après une lésion de l'endothélium entraînant l'activation de ses cellules et le dépôt de lipides. Plusieurs études ont démontré une corrélation significative entre le degré de l'inflammation de la valve aortique et le développement de la calcification. Dans ces études, les patients atteints de SA sévère présentaient une forte réaction inflammatoire et une calcification [107]–[109].

(1) Infiltration des cellules immunitaires et les cytokines

Une valve aortique normale contient très peu de cellules immunitaires qui se limitent aux macrophages et aux mastocytes. Des études ont démontré que l'augmentation de la densité de leucocytes dans une valve calcifiée est corrélée à la sévérité de la sténose et la dégradation des paramètres hémodynamiques donc une progression rapide de la maladie [110], [111]. D'autres études ont démontré que les régions calcifiées sont riches en lymphocytes, macrophages et cellules de type ostéoblaste. Par conséquent, l'inflammation participe au processus de la fibrose et de la minéralisation [111]. Une fois dans la valve, les cellules inflammatoires (particulièrement les macrophages) produisent un cocktail cytokinique (IL-1 β , IL-6, IL-8), les facteurs de croissance ostéogéniques, le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), l'IGF-1 (*Insulin Growth factor*) et le TGF- β . Ces derniers sont responsables de la transdifférenciation cellulaire (Figure I-20). Elles produisent également des enzymes protéolytiques (collagénase-1/MMP-1, collagénase-3/MMP-13, gélatinase A/MMP-2 et gélatinase B/MMP-9) et des cystéines endoprotéases (cathepsines K et S) responsables, cette fois, du remodelage de la matrice extracellulaire (Figure I-20).

L'analyse des échantillons humains des valves de patients atteints de SA a permis la caractérisation des cellules immunitaires infiltrantes. Wu et collaborateurs ont étudié les populations lymphocytaires chez les patients atteints d'une SA sévère. Ils ont montré que les lymphocyte T CD8⁺/CD28⁻ étaient présents à proximité des nodules calcifiés de la valve aortique. De même, ils jouent un rôle crucial dans la SA, comme le montre la corrélation entre le degré d'expansion clonale et la sévérité de la calcification valvulaire [112]. Une autre équipe a montré des agrégats de lymphocytes infiltrants contenant des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, avec une prépondérance des cellules T CD4 dans les valves des patients atteints de SA bicuspide

et tricuspide [113]. De plus, le niveau d'activation des lymphocytes T circulants est fortement corrélé au degré de calcification de la valve indiquant que le niveau d'activation du système immunitaire est lié à la sévérité de SA calcifiée [113].

Les cytokines jouent également un rôle important dans le développement de la SA. C'est le cas de l'IL-6 qui est une cytokine sécrétée par différents types cellulaires tels que les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Elle est surexprimée dans les VICs humaines des valves calcifiées [114]. Une étude de El Husseini et collaborateurs a démontré que les VICs traitées avec IL-6 surexprimaient les marqueurs ostéogéniques (Runx2, Ostéopontine, BMP-2), le TGF- β 1 ainsi que le collagène IA1 et présentaient plus de calcification [114]. L'IL-1 β participe également au processus de calcification de la valve. Son expression augmente dans les valves aortiques sténosées [65]. L'IL-1 β augmente l'expression des MMPs qui, à leur tour, exacerbent le processus de sténose valvulaire et activent la voie NF- κ B. Ce qui conduit à la synthèse de plusieurs cytokines telles que l'IL-6, l'IL-8 et la chémokine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*). Ces cytokines participent au processus pathologique de la SA [58]. L'IL-18, l'une des principales cytokines pro-inflammatoire, est aussi exprimée dans les valves aortiques sténosées et est positivement corrélée à la sévérité clinique de la SA [115]. En effet, L'IL-18 augmente significativement l'expression génique et protéique de α -SMA. De plus, le traitement des VICs par IL-18 favorise l'expression des ARNm de l'ostéopontine et de Runx2 ainsi que l'activité de l'ALP en présence d'un milieu ostéogénique [115]. Contrairement aux précédentes cytokines, l'IL-37 est une cytokine anti-inflammatoire de la famille de l'IL-1. Elle inhibe les processus ostéogéniques en réduisant l'expression de la BMP-2 et l'ALP. Cette dernière est peu exprimée dans la SA, par conséquent la forte expression de BMP-2 peut favoriser la calcification des VICs par l'expression de l'ALP. Ceci entraîne par la suite un épaissement valvulaire aortique [116]. Ces observations confirment l'effet protecteur d'IL-37 sur la calcification de la valve.

Le TGF- β 1 est connu pour stimuler la fibrose et la minéralisation de la valve dans la SA. Il participe entre autres à la différenciation myofibroblastique dépendante de SMAD [117], [118] et à la minéralisation dépendante de l'apoptose [119]. Plusieurs études ont démontré que le TGF- β 1 contribue à la transition endothélio-mésenchymateuse des VECs en augmentant leur expression d' α -SMA [120], [121]. En outre, le TGF- β 1 stimule la contraction de la matrice extracellulaire par les VICs porcines cultivées dans une matrice de collagène en 3 dimensions [118]. Le TGF- β 1 peut également activer la MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) qui

favorise la synthèse du collagène, la formation de nodules, le stress oxydatif et la sénescence cellulaire [122]. L'effet pro-calcifiant du TGF- β 1, suite à l'activation de SMAD2/3 dans les VICs porcines et humaines des valves calcifiées, entraîne une liaison accrue des LDL aux chaînes de glycosaminoglycanes. Ce qui entraîne le dépôt TGF- β 1 dans la MEC [123]. L'activité de l'ALP et la formation de nodules calcifiés dans les VICs porcines sont également médiées par la voie non canonique du TGF- β 1 [124]. L'activation du récepteur du TGF- β 1 induit également l'expression de la cadhérine-11 qui permet la formation de nodules en se liant à l' α -SMA [125]. Enfin, les patients atteints de SA ont un taux sanguin de TGF- β 1 trois fois plus élevé que les témoins sains [126]. D'autres membres de la superfamille des TGF- β peuvent aussi induire la calcification. En effet, le traitement des VICs humaines saines par TGF- β 1/ β 3, BMP-2/4/7 entraîne une augmentation de l'activité de l'ALP et de l'expression de l'ostéocalcine [127].

D'autres molécules du processus inflammatoire participent à la physiopathologie de la SA telles que la cyclo-oxygénase 2 (COX-2). C'est une enzyme qui joue un rôle crucial dans la synthèse des leucotriènes et des prostaglandines. Elle participe également à l'ostéogenèse notamment celle via la mécanotransduction [128]. La HMGB1 (*high-mobility group box 1*), une protéine constitutive de la chromatine, est également impliquée dans la SA. C'est un ligand du récepteur TLR4 (*Toll-like 4*) qui joue un rôle important dans l'inflammation et l'initiation de la réponse antigène spécifique de l'immunité adaptative. Chez les VICs humaines, la HMGB1 subit une translocation du noyau vers le cytoplasme puis vers l'espace extracellulaire où elle exerce son effet inflammatoire [129]. Ce processus est dépendant de l'ostéopontine, un marqueur connu de la calcification. L'expression de l'ostéopontine est accrue dans les valves humaines calcifiées, de même que la quantité de HMGB1 dans le milieu extracellulaire et dans certaines VECs [129].

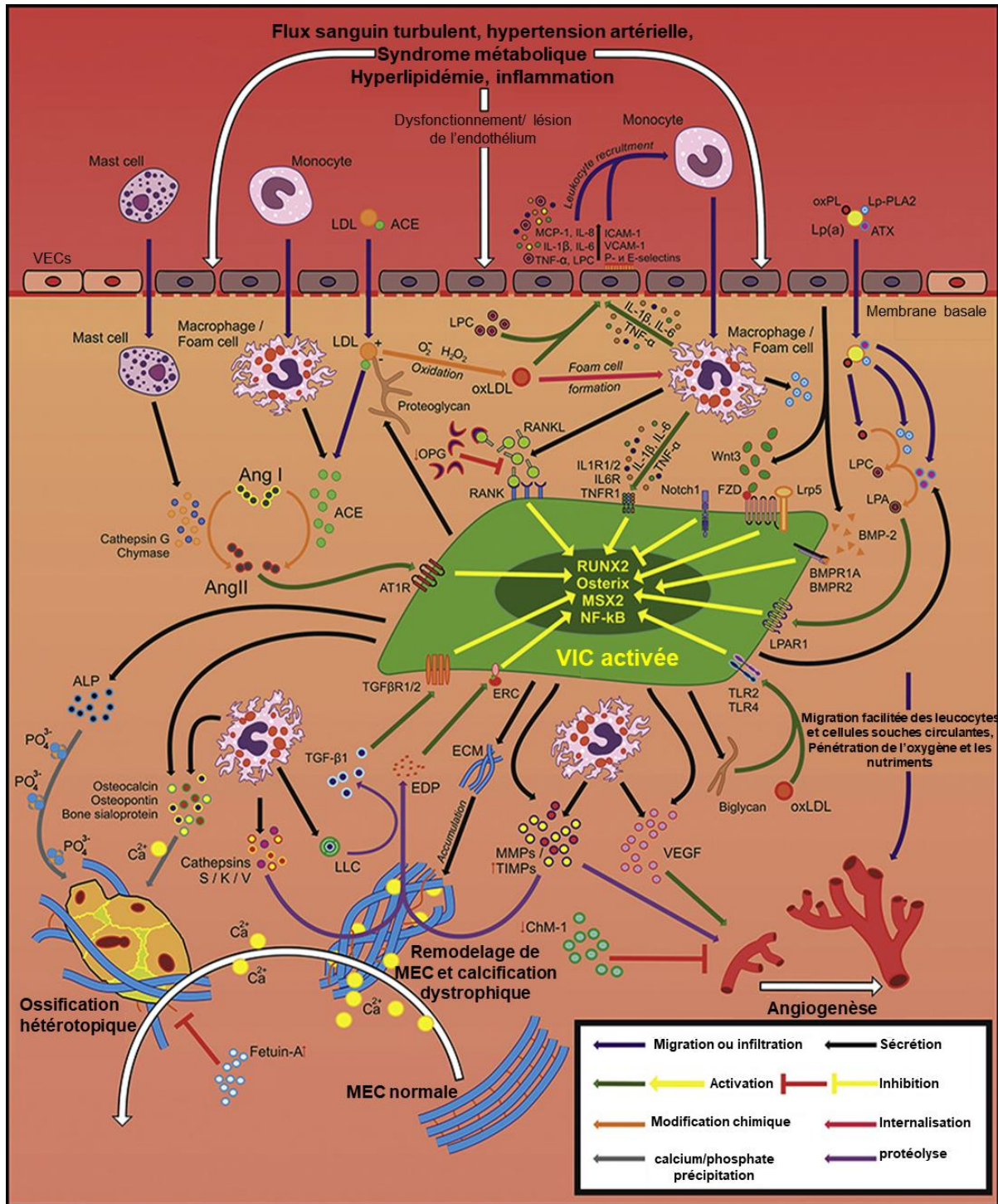


Figure I-20 : Processus moléculaires de la SA

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine, AngI/II : angiotensine I/II, AT1R : récepteurs de l'AngII de type 1, ATX : autotaxine, ChM-1 : chondromoduline-1, EDP : produits de dégradation de l'élastine, ERC : complexe récepteur de l'élastine, FZD : récepteur frizzled, LLC : large latent complex, LPA : acide lysophosphatidique, LPAR1 : récepteur de LPA 1, LPC : lysophosphatidylcholine, Lp(a) : lipoprotéine(a), Lrp5 : low-density lipoprotein receptor-related protein 5, OPG : ostéoprotégérine, oxPLs : phospholipides oxydés. Certains mécanismes sur cette figure n'ont pas été abordés dans ce travail. Voir la liste des abréviations pour celles non indiquées. Figure modifiée d'après Kostyunin *et al.* [106].

(2) Dépôt de lipides et stress oxydatif

La SA est caractérisée par un dépôt de lipides dans la MEC de la valve consécutive d'une lésion endothéliale. Ce dépôt de lipides participe au remodelage de la valve et à sa minéralisation. Parmi les éléments du métabolisme lipidique impliqués dans la physiopathologie de la SA, nous avons notamment la sphingosine-1-phosphate (S1P) qui est un lipide médiateur de la signalisation cellulaire. L'administration concomitante de S1P et de lipopolysaccharides (LPS) induit une réponse pro-inflammatoire synergique, notamment en augmentant l'expression de l'IL-6/8, la COX-2 et l'ICAM-1 chez les VICs [130]. La S1P et les LPS se fixent sur les récepteurs 1/3 de la S1P et des TLR4 respectivement puis ils activent les voies de signalisation de MAPK p38, protéine kinase C (PKC) et NF- κ B [130]. En outre, la stimulation des VICs par les LPS seuls active la voie de signalisation du NF- κ B. Cette activation entraîne la sécrétion de l'IL-6 et l'IL-8 ainsi que l'augmentation de l'expression de BMP-2 et de Runx2 [131].

La phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (Lp-PLA2, *lipoprotein-associated phospholipase A2*) est également fortement exprimée dans la valve aortique calcifiée. *In vitro*, la lysophosphatidylcholine, produit de l'activation de la Lp-PLA2, augmente l'expression de l'ostéopontine, de l'ALP et de l'autotaxine. Elle induit la calcification avec l'implication de l'enzyme autotaxine ainsi que l'apoptose par une voie dépendante de la protéine kinase A (PKA) [132]. De plus, l'expression de la phospholipase A2 des groupes IIE/V est associée à une expression accrue des marqueurs ostéogéniques dont BMP-2 ainsi que le degré de la réaction immunitaire [133]. Une autre enzyme du métabolisme lipidique impliquée dans la SA est l'autotaxine ou ectonucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1, comme mentionné ci-dessus. C'est une glycoprotéine qui transforme la lysophosphatidylcholine en acide lysophosphatidique (Figure I-20). Les valves aortiques calcifiées humaines présentent des niveaux élevés d'autotaxine. Elle est également exprimée par les VICs. De plus, l'autotaxine est colocalisée avec les phospholipides oxydés et l'apolipoprotéine A. L'autotaxine et l'acide lysophosphatidique accélèrent la minéralisation de la valve aortique via la voie NF- κ B/IL-6/BMP [134].

Un autre mécanisme important dans le développement de la SA est le stress oxydatif. En effet, les ROS générées par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) induisent une augmentation des dommages oxydatifs de l'ADN, une altération des enzymes de réparation de l'ADN et une diminution de l'expression de la superoxyde dismutase, de la catalase et d'autres antioxydants

ainsi que l'expression de Runx2 [135]. Ce mécanisme explique l'accumulation de ROS et le remodelage de la microstructure de la cuspide caractéristique de la sclérose de la valve aortique, la phase précoce de la SA.

Par ailleurs, les LDL oxydées (ox-LDL) jouent un rôle central dans l'activation de l'inflammation dans la SA [136]. Les oxLDL participent à la dégénérescence et à la calcification des tissus en s'accumulant dans les valves calcifiées [137]. La stimulation par l'oxLDL des VICs humaines saines augmente l'expression des transporteurs du phosphate inorganique favorisant l'accumulation du phosphate de calcium pendant la minéralisation [138]. En outre, la réponse immunitaire innée peut être déclenchée par les ox-LDL via l'activation des TLRs exprimés par les VICs et du facteur de transcription NF- κ B qui a pour effecteur la BMP-2 et le Runx2 (Figure I-20) [139].

a) Fibrose ou sclérose de la valve aortique

Au niveau histologique, une valve sclérosée présente une distribution et une composition de la MEC altérées telles que la fragmentation des fibres d'élastine, l'augmentation des fibres de collagène, la désorganisation des faisceaux de collagène et l'augmentation de l'activité des enzymes du remodelage de la MEC [140], [141].

(3) Différenciation myofibroblastique des VICs

En condition pathologique, la population des VICs s'active entraînant une proportion de plus de 30% des myofibroblastes et des VICs ostéoblastiques [7]. Les VICs quiescentes deviennent des VICs myofibroblastiques en réponse à des lésions pathologiques ou de stress hémodynamique/mécanique anormal. Ce qui entraîne l'apparition des VICs activées ou myoVICs, l'augmentation des cellules spumeuses (macrophages) et un certain nombre de chimiokines ainsi que des facteurs de croissance stimulant l'activation des VICs (Figure I-10).

L'activation des VICs s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion et de la dégradation de la matrice extracellulaire, de l'expression des MMPs et TIMPs, de l'expression des marqueurs de myofibroblastes tels que α -SMA, vimentine et SMemb (*embryonic non muscle myosin heavy chain*), ainsi que l'augmentation de leurs prolifération et migration [142]. Ces processus sont des caractéristiques importantes de la réparation d'une lésion tissulaire et

peuvent être régulés par le FGF-2 et le NO. En outre, les myoVICs sécrètent également plus de cytokines, notamment le TGF- β qui a des fonctions autocrines importantes [29].

Plusieurs facteurs physiques et moléculaires contrôlent l'activation des VICs. La densité cellulaire est un de ces facteurs. Une étude a démontré que la densité cellulaire affecte plusieurs protéines clés de l'activation des VICs notamment la β -caténine, la N-cadhérine, l' α -SMA, le TGF- β et les SMAD2/3 nucléaire [143]. Une autre étude a, quant à elle, démontré que la stimulation *in vitro* des VICs porcines en culture par le TGF- β 1 accélèrent leur différenciation en myofibroblastes avec l'expression d' α -SMA organisé en faisceaux appelés fibres de stress. A cela s'ajoute l'augmentation du remodelage de la fibronectine [117]. Par ailleurs, l'ensemencement de VICs sur une matrice enrichie en héparine et/ou fibronectine conduit à la rétention du TGF- β dans la MEC et entraîne leur activation. L'héparine seule induit l'expression d' α -SMA en se liant et en augmentant la synthèse de *novo* de TGF- β par les VICs, ce qui augmente leur activation [144]. En se fixant sur son récepteur TGF- β R1, le TGF- β 1 active SMAD2/3 qui une fois dans le noyau induit la surexpression des marqueurs des cellules du muscle lisse : α -SMA et SM22 α . Le TGF- β 1 permet également la stabilisation et la translocation nucléaire de la β -caténine qui est importante dans la différenciation par la voie Wnt/ β -caténine. Les voies de signalisation TGF- β 1/SMAD et TGF- β 1/ β -caténine sont conjointement activées lors de l'activation des VICs [145]. Après leur activation, les myoVICs forment des nodules puis les cellules à l'intérieur du nodule subissent des changements dystrophiques et une apoptose, ce qui entraîne la libération de facteurs qui stimulent la nucléation des cristaux de calcium [127].

(4) Remodelage de la matrice extracellulaire

Les caractéristiques de la SA sont entre autres les altérations majeures qui se produisent dans l'organisation, la composition et les propriétés mécaniques de la MEC. Au final, le remodelage inadapté de la MEC se traduit par des feuillets sclérosés raides qui obstruent le flux et compromettent la fonction cardiaque. En condition pathologique, l'augmentation du remodelage est médiée par l'activité des MMPs (MMP-1, MMP-3 et MMP-9), leurs inhibiteurs (TIM-1 et TIM-2) et les cathepsines avec une synthèse importante ainsi qu'un dépôt désorganisé des nouvelles fibres (Figure I-21) [7].

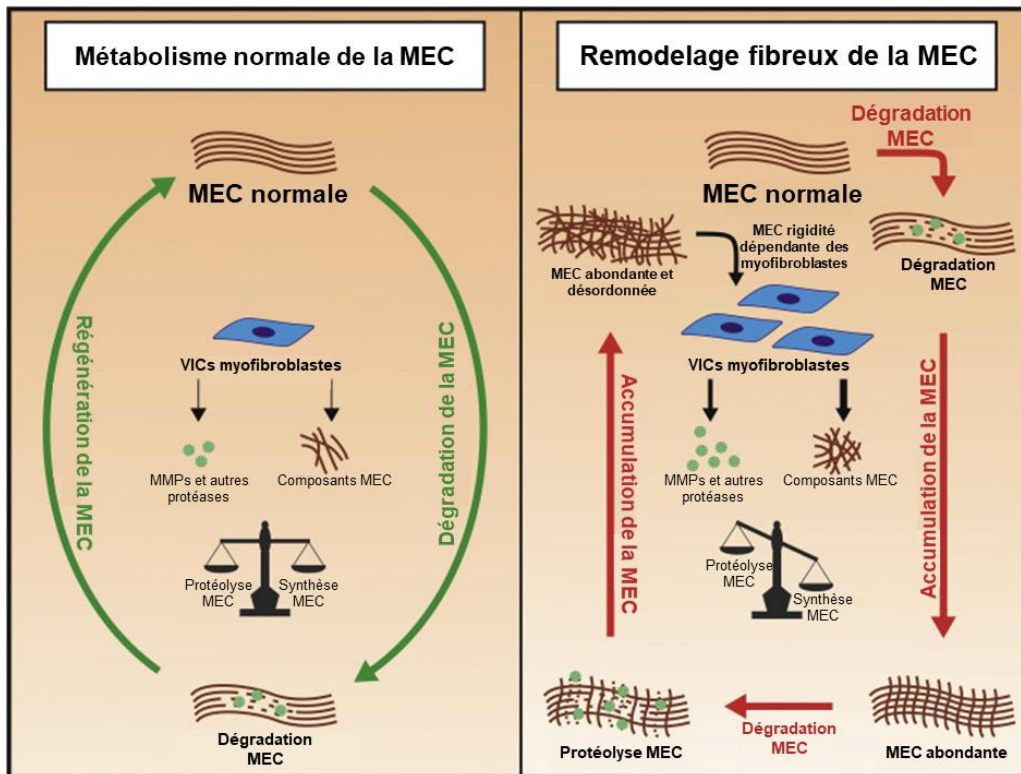


Figure I-21 : Remodelage pathologique de la MEC valvulaire

MEC : matrice extracellulaire, VICs : cellules interstitielles valvulaires. Figure modifiée d'après Kostyunin *et al.* [106].

Dans la SA, l'augmentation de la production de collagène conduisant à la fibrose valvulaire est suivie de l'augmentation de son renouvellement. Ce qui entraîne une diminution du contenu en collagène I et III et un remodelage de la MEC. Ces phénomènes induisent des changements physiopathologiques de la structure, la fonction et le phénotype des VICs. Huston et collaborateurs ont démontré que la SA est associée à un remodelage micro architectural spécifique du collagène. La majorité des altérations des fibres de collagène est localisée dans la couche *spongiosa*, où le nombre de fibres de collagène ainsi que la largeur et la densité des fibres sont augmentées. À l'inverse, ces changements ne sont pas observés dans la couche *fibrosa* [140].

De surcroît, la quantité des fibres d'élastine est réduite dans la couche *ventricularis* et les fibres sont désorganisées et fragmentées lors de la SA [5]. La surexpression des protéases telles que les MMP-2/9 et les cathepsines S/K/V/G seraient à l'origine de la perte et la fragmentation des fibres d'élastine (Figure I-20). En effet, la déficience en cathepsine S réduit la fragmentation de l'élastine et la calcification dans la valve aortique chez les souris *knock-out* pour l'apolipoprotéine E atteinte d'une maladie rénale chronique induite chirurgicalement [7].

De plus, la dégradation de l'élastine dans la valve aortique entraînent une légère augmentation de la rigidité des feuillets [146].

Au cours de la SA, les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes agissent en retenant l'eau, le TGF- β et les lipides. Ce qui attire les cellules inflammatoires et provoque la calcification [48]. Les petits protéoglycanes riches en leucine (versicane, décorine et biglycane) et l'acide hyaluronique sont abondants dans le contour immédiat des nodules calcifiés mais absents à l'intérieur. Ils jouent également un rôle dans la physiopathologie de la SA [147]. En outre, la quantité de protéoglycanes et d'acide hyaluronique augmentent dans les 3 feuillets avec l'âge et le développement de la pathologie [5], [147], [148]. Le biglycane et la décorine sont présents dans les régions de formation précoce de nodules calcifiés des valves aortiques humaines [147]. Ils peuvent ainsi contribuer à l'accélération de la pathologie en piégeant le TGF- β ou d'autres facteurs de croissance associés à la SA [7]. Par ailleurs, l'expression du biglycane est corrélée à la sévérité de sténose [149]. Elle est plus élevée dans VICs humaines issues des valves sténosées par rapport à celles des valves saines. Les oxLDL stimulent l'expression du biglycane dans les VICs humaines et ce dernier se fixe sur le TLR2, dont les effecteurs sont la BMP-2 et l'ALP (Figure 20). De plus, en se liant au TLR2, le biglycane induit la production de la protéine de transfert des phospholipides. C'est une protéine majeure impliquée dans le métabolisme lipoprotéique, l'inflammation et la rétention des lipides [150]. Ce processus montre le lien entre l'inflammation, le dépôt lipidique et calcification de la valve.

Dans la physiopathologie de la SA, la périostine favorise le développement des marqueurs de la pathologie y compris l'angiogenèse et l'augmentation des MMPs. A l'inverse, elle prévient la pathologie en réprimant la calcification associée à l'ostéogénèse. Ces rôles contradictoires pourraient être expliqués par l'expression spatiale de la périostine dans la pathologie. D'une part, elle a une forte expression dans la couche *ventricularis* et la couche *spongiosa* où se produit l'angiogenèse [50]. D'autre part, son expression est faible dans la couche *fibrosa* où se produit la calcification [151]. Chez l'homme, l'expression de la périostine est plus faible dans les VICs provenant des valves calcifiées que celles des valves saines. De plus, la stimulation par des LPS des VICs cultivées sur du collagène diminue l'expression de la périostine [152].

Dans les valves aortiques normales, l'expression de la ténascine-C se limite à la membrane basale. Alors que dans les valves sténosées, elle est présente dans toutes les couches de la valve ; notamment dans les nodules calcifiés. Les myoVICs sont la principale source de

ténascine-C dans les valves malades et l'expression de cette dernière est corrélée à la progression de la SA [51]. La téna-scine-C est surexprimée dans les valves humaines calcifiées. De plus, l'expression de la MMP-2 et son activité protéase collagénolytique sont augmentées par l'ajout de téna-scine-C à des VIC aortiques humaines ou ovines en culture [153].

Les MMPs et les TIMPs sont connus pour favoriser le remodelage de la matrice extracellulaire. Les niveaux d'expression et d'activité de MMP-3, MMP-9 et TIMP-1 sont accrus dans les valves aortiques humaines calcifiées [141]. De plus, le TNF- α et le MMP-1 sont également surexprimés dans les valves humaines sténosées [154]. La quantité de collagène et d'élastine de la valve aortique diminue généralement avec l'âge. Cette diminution est associée à l'augmentation des enzymes qui dégradent l'élastine et le collagène telles que les cathepsines et les MMPs. La surexpression des cathepsines (cathepsines S/K/V) et des MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-12) sont nécessaires au remodelage valvulaire et à la calcification dans la SA [155]. Les TIMPs seraient différenciellement exprimés au cours de la SA. Les TIMP-1/2 sont surexprimés tandis que les TIMP-3/4 sont régulés à la baisse [155], [156].

En plus des MMPs et des TIMPs, d'autres molécules régulent le remodelage de la MEC ; notamment les protéases ADAMT (*A Disintegrin And Metalloprotease with thrombospondin motifs*) qui sont localisés dans les couches *fibrosa* et *ventricularis*. Ils sont entre autres impliqués dans la protéolyse de l'agrécan et le versicane. Les VICs issues des valves aortiques calcifiées expriment moins d'ADAMTS5 comparées à celles issues des valves saines. Cette régulation négative est plus importante du côté aortique de la valve. L'ADAMTS5 participe également à la transition myofibroblastique et ostéoblastique des VICs via l'augmentation de la matriline-2 (un substrat d'ADAMTS5) qui à son tour active la voie de la signalisation NF- κ B pour induire la transition phénotypique des VICs [157].

(5) Angiogenèse

En condition physiologique, les feuillets valvulaires sont avascularisés et exempts de lymphocytes et monocytes infiltrants. Le développement de la SA, s'accompagne de la mise en place d'une néoangiogenèse (Figure I-20). Ce mécanisme commence dans la couche *fibrosa* du feuillet valvulaire et s'y développe majoritairement. L'épaississement des feuillets valvulaires et la fibrose au cours de la phase précoce de la SA s'accompagnent d'une hypoxie. Elle participe à la stabilisation de HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 alpha*) qui, à son tour, induit une adaptation métabolique en régulant le facteur de croissance de l'endothélium

vasculaire (VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*) à la hausse et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Si d'une part, la néovascularisation restaure la normoxie. D'autre part, elle est responsable de l'activation des VICs et du remodelage de la MEC ainsi que la formation de nodules calcifiés. En effet, l'HIF-1 α est surexprimé dans les nodules calcifiés des valves aortiques et les différentes voies de signalisation impliquées dans le remodelage de la MEC sont activées, notamment NF- κ B et les MMP-2/9 [158]. L'hypoxie joue également un rôle important dans le remodelage de la MEC en régulant le métabolisme de l'élastine et du collagène [158].

L'analyse histopathologique des valves aortiques humaines calcifiées a montré la présence des vaisseaux sanguins et qu'elles expriment le RANKL, le VEGF ainsi que les protéines de la matrice osseuse telles que l'ostéopontine et l'ostéocalcine [159]. De plus, l' α -SMA, Tie-2 et VEGFR-2 sont plus exprimées dans les cellules de la valve aortique humaine calcifiée que dans celles d'une valve normale. Leur coexpression augmente ainsi le potentiel angiogénique de ces cellules [160], [161].

La chondromoduline-I (Chm-I) est une glycoprotéine présente principalement dans les tissus avasculaires comme l'œil et le cartilage [162]. Des études ont démontré qu'elle inhibe la prolifération des cellules endothéliales et la vasculogénèse [163], [164]. La Chm-I est exprimée dans les quatre valves cardiaques au cours du développement. Son expression persiste après la naissance dans la MEC valvulaire, où elle maintient l'homéostasie en empêchant l'angiogénèse. Néanmoins, son expression est diminuée dans les régions de néoangiogénèse dans la valve humaine malade [165]. *In vitro*, la Chm-I dérivée des VICs inhibe la migration des cellules endothéliales et l'angiogénèse en plus d'induire l'apoptose [165]. Dans la SA, l'angiogénèse pourrait favoriser et accélérer l'inflammation. En effet, les régions où l'expression de la Chm-I est réduite dans les valves malades sont associées à la présence des macrophages infiltrants [165].

c) Minéralisation de la valve aortique

La minéralisation de valve est un processus actif médié par les VICs. Elles acquièrent un phénotype ostéoblastique et pro-calcifiant en réponse à différents stimuli tels que des médiateurs de l'inflammation, une lésion endothéliale, une accumulation des LDL, des ROS, un niveau élevé de calcium/phosphate inorganique et des contraintes hémodynamiques [166]. La minéralisation de la valve commence au niveau de la couche *fibrosa* la plus soumise au

stress mécanique dans la zone charnière (*hinge*) du feuillet valvulaire. La calcification s'accompagne d'un dépôt anormal de collagène et d'une expansion de l'expression des protéoglycannes. Ceci conduit à la rigidification de la valve et au dépôt passif d'hydroxyapatite. En outre, des nodules calcifiés microscopiques peuvent être présents à proximité de la lésion endothéliale. A l'intérieur de ces nodules, les cellules subissent l'apoptose et les fibres de la MEC sont dégradées. Ils servent de substrat pour le dépôt de calcium et de phosphate [158].

(1) Différenciation ostéogénique des VICs

L'un des acteurs majeurs de la minéralisation de la valve est la VIC ostéoblastique. A un stade de la progression de la pathologie, les VICs acquièrent un phénotype ostéoblastique favorisant la biominéralisation de la valve. Néanmoins, leur niveau d'expression des marqueurs ostéogéniques est moindre comparé à celui des ostéoblastes de l'os [167]. La différenciation ostéoblastique des VICs est similaire à l'ostéogénèse physiologique et elle est majoritairement régulée par Runx2 et BMPs. La différenciation des VICs en cellules de type ostéoblaste se traduit par l'expression des marqueurs ostéoblastiques tels que l'ALP, la BMP-2/4, l'ostéopontine, l'ostéocalcine et la sialoprotéine osseuse (Figure I-22) [127].

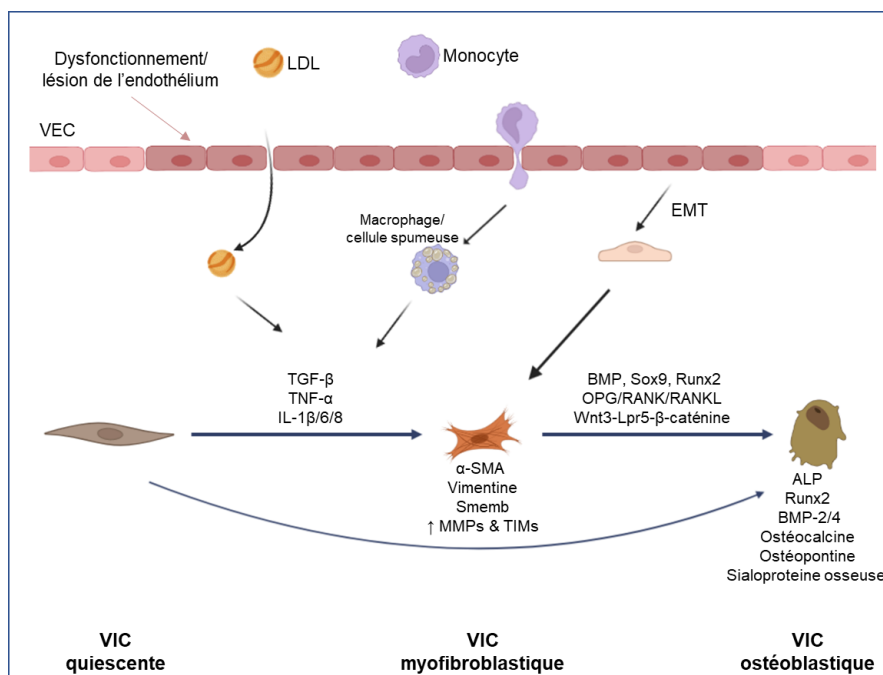


Figure I-22 : Différenciation ostéogénique des VICs.

Différenciation des VICs quiescentes en VICs ostéoblastiques via ou non les VICs myofibroblastiques. Différenciation des VECs en myoVICs puis obVICs. EMT : Transition endothélio-mésenchymateuse
Figure réalisée avec BioRender.

Des études ont démontré que seule une sous population des VICs se différencie en obVICs et que cette spécificité serait d'origine embryonnaire [168]. En outre, d'autres types cellulaires participent à la population des obVICs comme les cellules progénitrices mésenchymateuses et les VECs. La valve aortique est riche en cellules progénitrices mésenchymateuses qui ont un fort potentiel ostéogénique. Ces cellules peuvent ainsi contribuer à la calcification de la valve [169]. Les VECs peuvent également se différencier en ostéoblastes via la transition endothélio-mésenchymateuse [170]. Elles perdent alors leur phénotype endothélial au profit d'un phénotype mésenchymateux ou myofibroblastique puis par la suite elles peuvent se différencier en ostéoblaste [170]. En plus des ostéoblastes, les ostéoclastes sont aussi présents dans la valve aortique calcifiée. Une étude a observé la présence des ostéoclastes dans environ 13% des valves aortiques de patients [171]. Ils résorbent les nodules calcifiés ce qui conduit à une progression lente de la SA [172], [173].

Les expérimentations *in vitro* ont démontré que le milieu ostéogénique ou pro-calcifiant induit la surexpression des marqueurs ostéogéniques et la diminution de l'expression des marqueurs myofibroblastiques chez les VICs. En effet, cultiver les VICs dans un milieu ostéogénique entraîne une diminution de l'expression de l' α -SMA et induit l'expression de l'ALP dans toutes les populations des VICs. Cependant, seules les obVICs montrent une forte expression de l'ostéocalcine : un marqueur tardif de la calcification [167]. Ces observations suggèrent que les VICs peuvent se différencier en obVICs sans forcément passer par un phénotype myofibroblastique. Les VICs subissent également une différenciation ostéoblastique en présence de BMPs et de TGF- β [174].

(2) Mécanismes de minéralisation

La mise en place de la minéralisation progressive de la valve se fait par deux mécanismes différents : la calcification dystrophique et la biominéralisation. L'analyse histologique des valves aortiques a montré que la majorité de la calcification de la valve est dystrophique. Cependant, des nodules cartilagineux et de l'os lamellaire mature ont également été décrits, signes d'une calcification active [171]. Dans une étude, Mohler et collaborateurs ont observé que 13% des valves aortiques humaines calcifiées présentaient un os laminaire avec des éléments de la moelle mature [171].

La **calcification dystrophique** est un dépôt passif d'hydroxyapatite sur la MEC dégradée sans l'implication des ostéoblastes. Ce processus est majoritaire et secondaire à l'activation des VICs en myofibroblastes (Figure I-23). Les myoVICs sont l'acteur principal de la calcification dystrophique. Elles contractent la MEC et les cellules contenues dans la matrice désorganisée subissent l'apoptose. Ce qui entraîne le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite au niveau des sites de nucléation tels que les fragments des fibres clivées de collagène et d'élastine, la sialoprotéine osseuse, les cristaux de cholestérol et les corps apoptotiques. Les cristaux d'hydroxyapatite sont issus de la transition amorphe-cristalline du calcium et du phosphate dissous dans le sang qui précipitent dans la MEC endommagée [106], [175].

La **biominéralisation** ou l'ossification est un processus ostéogénique actif semblable à celui observé dans l'os (Figure I-23). Les obVICs sont à l'origine de cette minéralisation et sécrètent les éléments de la matrice osseuse tels que l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse ; ainsi que des vésicules extracellulaires riches en calcium et en ectonucléotidase [52], [166], [176]. Ces vésicules contiennent des ectonucléotidases (l'ALP, l'autotaxine et la 5'-nucléotidase) qui génèrent du phosphate inorganique à partir des nucléotides et pyrophosphates endogènes. De plus, la surface de ces vésicules contient l'annexine qui a une forte affinité pour le calcium. Ensemble, ils entraînent la formation des cristaux de phosphate de calcium qui interagissent avec la MEC. Ces vésicules servent aussi de site de nucléation. Au final, une ossification hétérotopique de la valve a lieu, c'est-à-dire, la formation d'un tissu de type osseux et cartilagineux [106].

En culture, les premiers signes de la calcification sont traduits par l'augmentation de l'activité de l'ALP et l'activation de facteurs ostéogéniques Runx2 et BMP-2 [153]. Le signe tardif de la calcification est la détection du calcium par la coloration au rouge alizarine ou au Von Kossa.

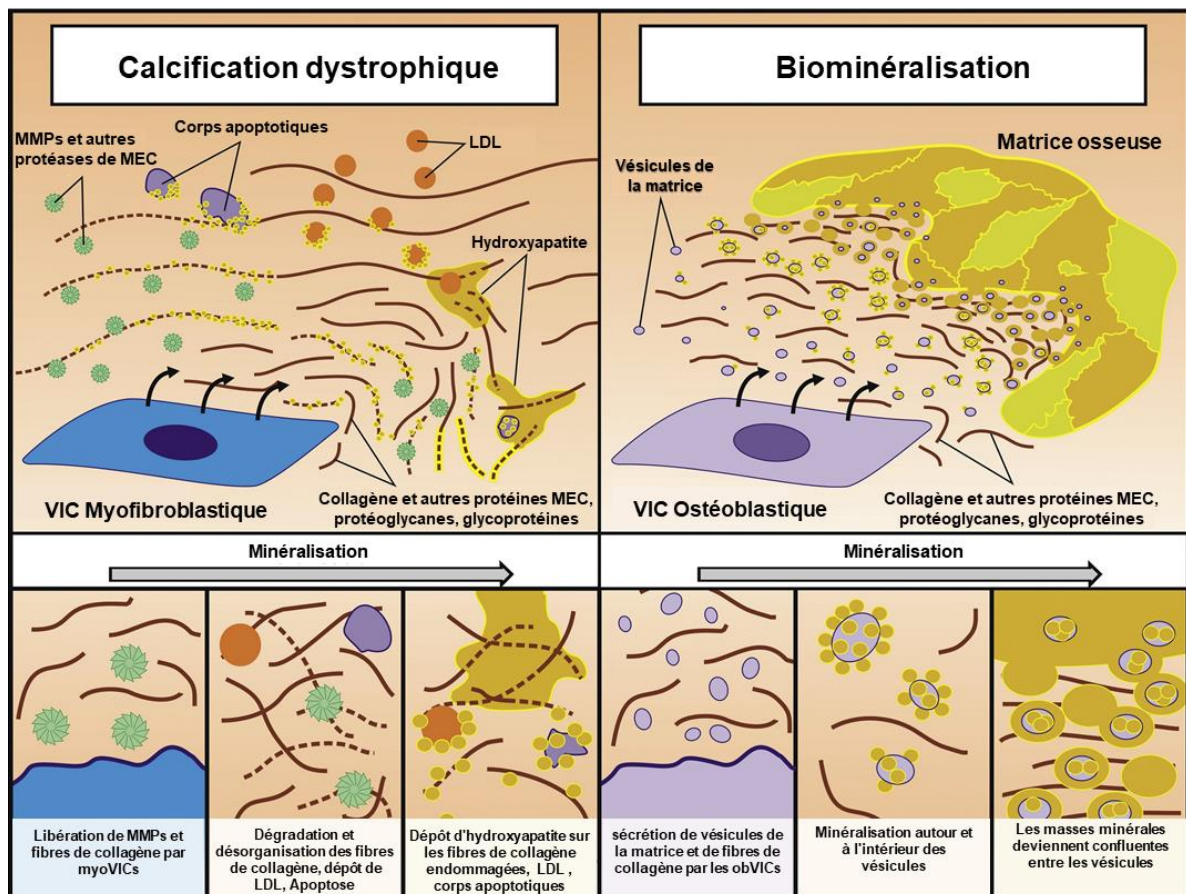


Figure I-23 : Les deux mécanismes de la minéralisation de la valve.

Gauche : calcification dystrophique avec l'implication des VICs myofibroblastiques. Droite : biominéralisation avec la participation des VICs ostéoblastiques. Figure modifiée d'après Kostyunin *et al.* [106].

(3) Acteurs de la minéralisation

La minéralisation de la valve aortique est régulée par plusieurs voies de signalisation. Comme évoqué précédemment, ces processus sont ceux observés au cours du développement de la valve et de l'ostéogénèse [22].

La BMP est l'un des principaux régulateurs de la minéralisation de la valve. Elle active deux voies de signalisation. L'une canonique avec les SMADs où SMAD1 active l'expression de l'ostéopontine et l'autre non canonique dans laquelle ERK active l'expression de Runx2. En effet, la phosphorylation de ERK après la stimulation par le LPS est plus importante et plus soutenue dans les VICs humaines issues des valves aortiques calcifiées [177]. En outre, l'étude de la voie de signalisation de BMP-2 a montré qu'elle peut activer parallèlement la voie ostéogénique médiée par le facteur de transcription Msx2 qui induit les voies Wnt et la voie

chondro-ostéogénique impliquant le facteur de transcription Runx2 [178], [179]. Par ailleurs, la BMP-2 est présente dans les lésions de la valve aortique humaine. Elle stimule la formation des nodules calcifiés par les VICs *in vitro* et son expression et celle de la sialoprotéine osseuse sont augmentées dans les valves humaines sténosées [180]. De plus, plusieurs études ont montré que les BMP-2/4 sont exclusivement exprimées dans les régions calcifiées des valves aortiques sténosées [171], [177], [180].

A la BMP-2, s'ajoutent d'autres voies de signalisation impliquées dans la calcification de la valve. Albanese et collaborateurs ont démontré que le dépôt d'hydroxyapatite dans la calcification des valves cardiaques est médié par la voie de signalisation Wnt non canonique. Le marquage de Wnt5b/11 est corrélé à la présence de la calcification, de la fibrose et des microvaisseaux dans la valve aortique humaine calcifiée [181]. De plus, dans la valve aortique humaine malade, l'expression de Msx2 est plus importante dans les régions calcifiées ; ce qui est associé à une augmentation de la signalisation Wnt et à la prolifération cellulaire [182].

Le Sox9 est un autre facteur de transcription qui participe à la calcification de la valve aortique. Peacock et collaborateurs ont démontré que le *knockdown* spécifique de Sox9 dans la valve *in vivo* entraîne une calcification ectopique et la diminution de son expression nucléaire précède le début de la calcification dans les VICs [183]. En outre, l'inhibition de la β -caténine augmente l'expression nucléaire de Sox9 dans les VICs ainsi que ses gènes effecteurs de la MEC : Agrécan, Collagène IIA1 et Collagène XA1. Ce mécanisme est associé à la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et traduit une différenciation chondrogénique [184].

L'Osterix ou facteur de transcription Sp7 est impliqué dans la formation osseuse, la différenciation des ostéoblastes et l'expression de l'ostéocalcine. Il régule également la calcification de la valve. L'Osterix est un effecteur en aval de Runx2. L'expression de Runx2 et Osterix est augmentée dans les VICs humaines entourant les régions calcifiées [185]. De plus, la surexpression de ses gènes cibles (Runx2, collagène X et ostéocalcine) a été observée dans la SA [186]. Par conséquent, la surexpression d'Osterix, de Runx2 et des protéines de la matrice osseuse confirme la présence d'un processus de biominéralisation dans la SA.

Cependant, d'autres facteurs ont un effet protecteur contre la minéralisation de la valve. Il s'agit de la voie de signalisation Notch ; notamment Notch 1 via les effecteurs de Sox9 [187]. Des études *in vitro* ont montré que Notch1 inhibe l'activation de Runx2 [188]. Néanmoins, un effet inverse de Notch a été observé chez les VICs issues des valves malades. En effet,

l'activation de Notch augmenterait la réponse pro-ostéogénique [189]. Par ailleurs, le facteur de transcription TWIST est exprimé dans les progéniteurs des ostéoblastes. Il favorise la chondrogenèse et inhibe la différenciation ostéoblastique de ces cellules en réprimant l'expression du facteur ostéogénique Runx2. L'expression de TWIST est réduite dans les VICs humaines calcifiées par rapport aux cellules saines. La surexpression de TWIST dans les VICs diminue l'expression des marqueurs ostéogéniques Runx2, ostéocalcine, ostéopontine et ALP [190].

Bien qu'étant le principal acteur cellulaire de la physiopathologie de la SA, les VICs ne sont pas les seules à être impliquées dans le développement de la maladie. Les VECs jouent également un rôle important dans la pathologie. Des récentes études ont montré le rôle protecteur des VECs dans la minéralisation de la valve aortique. Les VECs préviennent la formation de nodules calcifiés par les VICs porcines *in vitro* et des perturbations de la communication entre les VECs et les VICs favorisent l'apparition de la calcification [36], [37], [191], [192]. Les VECs sécrètent des facteurs paracrines protecteurs (NO, TGF- β ,...) qui ont pour cibles Notch1 et Sox9 dans les VICs et potentiellement dans les VECs elles-mêmes [36], [191]. De plus, les VECs empêchent l'activation des VICs *in vitro* et les VICs à leur tour empêchent la transition endothélio-mésenchymateuse des VECs. Ceci suggère l'implication d'une communication entre les VICs et les VECs dans la physiopathologie de la SA [192]. En coculture, dans un milieu ostéogénique, les VECs empêchent la calcification des VICs porcines en inhibant la différenciation myofibroblastique et ostéoblastique des VICs ; ainsi que le dépôt de calcium via la synthèse du NO [37]. Dans ces conditions, une expression différentielle de la NO synthase est également observée. Les VECs qui sont du côté ventriculaire, où la calcification est peu présente, expriment plus de NO synthase que celles du côté aortique [37]. Les VECs inhibent également l'activation myofibroblastique des VICs porcines TGF- β 1 dépendante en culture sur une matrice dure. Une fois de plus, le NO est impliqué dans cet effet des VECs sur les VICs [193]. Par ailleurs, White et collaborateurs ont démontré que les forces de cisaillement activent Notch dans les VECs. Ce dernier régule positivement la protéine Gla qui est fortement exprimée dans la valve et inhibe la calcification en séquestrant la BMP [194].

Cependant, d'autres études ont démontré l'effet contraire des VECs dans la physiopathologie de la SA. En effet, elles induiraient la calcification en activant les VICs. Lors que les VECs sont en coculture avec les VICs porcines dans un milieu ostéogénique, elles activent le remodelage pathologique et la calcification via une signalisation paracrine et la

transition endothélio-mésenchymateuse [195]. Le milieu conditionné des VECs traitées avec l'hormone parathyroïdienne entraîne la surexpression des molécules ostéogéniques : BMP-2/4, ostéocalcine et TGF- β 1 ainsi que la sous expression du collagène I/III [196]. De même, le milieu conditionné des VECs soumises à une oscillation maximale du flux active la calcification des VICs [197]. De ce fait, le dysfonctionnement des VECs favorise la SA.

5. Sténose aortique radio-induite

a) Radiothérapie thoracique

La radiothérapie est une méthode de traitement locorégional qui utilise l'action biologique des rayonnements ionisants. Elle consiste à délivrer des rayonnements ionisants, généralement des rayons X, sur les cellules cancéreuses pour les détruire. L'irradiation altère l'ADN des cellules en les fragmentant ce qui les empêche de se diviser et entraîne leur mort. La radiothérapie est largement utilisée seule ou avec d'autres méthodes telles que la chirurgie ou la chimiothérapie.

La radiothérapie thoracique ou médiastinale est une méthode qui cible le thorax. Elle est utilisée pour traiter différents cancers tels que le lymphome de Hodgkin, le cancer du sein, du poumon et de l'œsophage. Par exemple, le traitement du lymphome de Hodgkin à un stade précoce par une chimiothérapie associée à une radiothérapie améliore le contrôle de la tumeur et la survie des patients [198]. Aussi, le traitement du cancer du sein précoce par radiothérapie après une chirurgie mammaire conservatrice réduit la récurrence locale et la mortalité [199].

A la suite d'une radiothérapie thoracique, les patients peuvent développer des complications cardiaques telles que la péricardite (aigüe ou chronique), des cardiomyopathies, des coronaropathies (athérosclérose), des troubles de conduction et des valvulopathies [200], [201]. La dose reçue au niveau du cœur est un facteur de risque majeur pour le développement de valvulopathie. L'étude des patients traités par chimiothérapie et radiothérapie a montré que, en plus de la dose reçue par le cœur, les effets combinés des volumes pulmonaire et cardiaque étaient corrélés à la survenue des valvulopathies. Un volume de l'oreillette gauche dépassant 25 Gy et un volume du ventricule gauche dépassant 30 Gy induisent un dysfonctionnement des valves mitrale et aortique [202].

b) Valvulopathies radio-induites

La radiothérapie est un des facteurs de risque de la sténose aortique. Les patients ayant subis une radiothérapie pour le traitement du cancer du sein et le lymphome d'Hodgkin peuvent développer une telle sténose. Le risque de développer la pathologie est lié à la dose reçue, le délai depuis l'exposition et l'utilisation concomitant de la chimiothérapie [199]. Les dommages valvulaires radio-induits sont caractérisés par une fibrose et une calcification de la valve [199]. De plus, Le cœur gauche est le plus touché par les conséquences de l'irradiation en particulier la valve aortique.

La période de latence entre la radiothérapie et le développement de la pathologie est de 10 à 20 ans. Le temps moyen de l'apparition d'une valvulopathie asymptomatique est de 11,5 ans contre 16,5 ans pour une valvulopathie symptomatique [203]. La durée moyenne entre les phases asymptomatique et symptomatique est de 5 ans [200]. La sévérité des dysfonctions valvulaires augmente avec le temps [204]. Cutter et collaborateurs ont montré que le risque de développer une valvulopathie augmente avec la dose d'irradiation pour le traitement du lymphome de Hodgkin. Ce risque augmente d'un facteur de 1,4 et 11,8 pour des doses de 30 Gy et 40 Gy, respectivement [204]. Une autre étude a confirmé que les doses supérieures à 30 Gy augmentent significativement l'incidence des valvulopathies [204]. Les patients atteints d'une valvulopathie radio-induite ont 9,8 fois plus de risque de subir une chirurgie que les patients sans antécédents de radiothérapie [205]. Une étude, sur une cohorte de patients atteints de SA et ayant subi un remplacement valvulaire, a démontré que les patients ayant précédemment reçu une radiothérapie présentaient une mortalité plus importante que le groupe contrôle. Ces observations soulignent l'impact négatif de l'irradiation même après le traitement de la maladie [206].

Les données sur l'incidence et la prévalence des valvulopathies, plus particulièrement la SA radio-induite, varient selon les études. Cette proportion varie entre 2 et 37% des patients ayant subi une radiothérapie thoracique pour le traitement de lymphome de Hodgkin [204]. Dans le cas du cancer du sein, la prévalence des valvulopathies chez les patientes ayant subi une radiothérapie varie entre 0,5 et 4,2% [207], [208]. En outre, Hull et collaborateurs ont rapporté que l'incidence de la SA est de 1, 4 et 6% ; respectivement à 5, 10 et 20 ans après l'irradiation chez ces patientes [209].

c) Mécanismes de la sténose radio-induite

La sténose aortique radio-induite est un mécanisme complexe et multifactoriel. Comme la SA classique, elle débute par une lésion des cellules endothéliales suite à l'irradiation qui active une inflammation aiguë et l'agrégation plaquettaire ; en plus de la production des espèces réactives de l'oxygène. Par la suite, nous observons un recrutement des cellules inflammatoires qui secrètent différentes cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18 et TNF α) entraînant des dommages tissulaires, un épaissement des feuillets et une fibrose accompagnée ou non d'une calcification [210].

Le stress oxydatif est un acteur important qui participe à la lésion de cellules endothéliales. Ce processus est médié par la radiolyse des molécules d'eau en espèces réactives de l'oxygène : superoxyde, radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène [210]. Ces dernières interagissent avec l'ADN, les protéines et les lipides. La production des oxLDL est alors observée et elles sont impliquées dans la physiopathologie de la SA comme décrite précédemment. De plus, l'irradiation entraîne une forte production des oxydes nitriques synthétases qui catalysent la synthèse du NO. Ce dernier réagit avec l'oxygène pour former les espèces réactives de l'azote (RNS, *reactive nitrogen species*) [210]. Les ROS et les RNS participent à plusieurs processus physiologiques. Par exemple, les ROS activent les mécanismes de prolifération, hypertrophie et fibrose [210]. L'irradiation est également connue pour activer des facteurs de croissance **fibrotiques** tel que le TGF- β 1 qui active les fibroblastes en myofibroblastes et stimule la synthèse du collagène [211].

L'étude des valves de patients atteints de SA radio-induite a mis en lumière une partie des processus physiopathologiques. Chez les patientes ayant subi une radiothérapie pour le cancer du sein ou le lymphome de Hodgkin, l'analyse histologique de leurs valves aortiques sténosées a montré des conséquences différentes selon la pathologie. La densité cellulaire est réduite avec une forte expression du collagène chez les patients traités pour le lymphome de Hodgkin. Ces patients présentent une sténose aortique fibrosée prématurée de la valve aortique, contrairement aux patientes traitées pour le cancer du sein qui présentent une sténose calcifiante dégénérative [212].

Des études ont également évalué les mécanismes par lesquelles l'irradiation des cellules interstitielles de la valve pourrait induire la SA. Nadlonek et collaborateurs ont démontré que l'irradiation des VICs, au césium-137 à 10 Gy, induisait une forte expression des marqueurs

ostéogéniques comme la BMP-2, l'ostéopontine, l'ALP et le Runx2 [213]. Une autre étude a démontré que l'irradiation des VICs en culture entraîne une perte du phénotype myofibroblastique au profit d'un phénotype ostéogénique favorisant la minéralisation. De plus, l'irradiation altère l'homéostasie de la MEC [214].

C. LE CANAL TRPM4

1. Les Canaux TRP

a) Généralités et structures

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires qui forment des pores à travers la membrane plasmique et qui permettent un flux ionique selon le gradient électrochimique. Ce sont des transporteurs passifs ne nécessitant pas d'apport énergétique.

Le canal TRPM4 est un membre de la superfamille des canaux cationiques non-sélectifs TRP (*Transient Receptor Potential*). Les canaux TRP sont présents dans différents tissus de l'organisme où ils jouent plusieurs rôles. Ils participent entre autres au maintien de l'homéostasie calcique soit en permettant le passage du calcium, soit en modifiant sa force électromotrice. Les canaux TRP sont perméables aux ions monovalents et divalents dont le calcium, à l'exception du canal TRPM4 et son homologue TRPM5 qui eux sont imperméables à cet ion. Inversement, les canaux TRPV5 et TRPV6 sont exclusivement perméables au calcium.

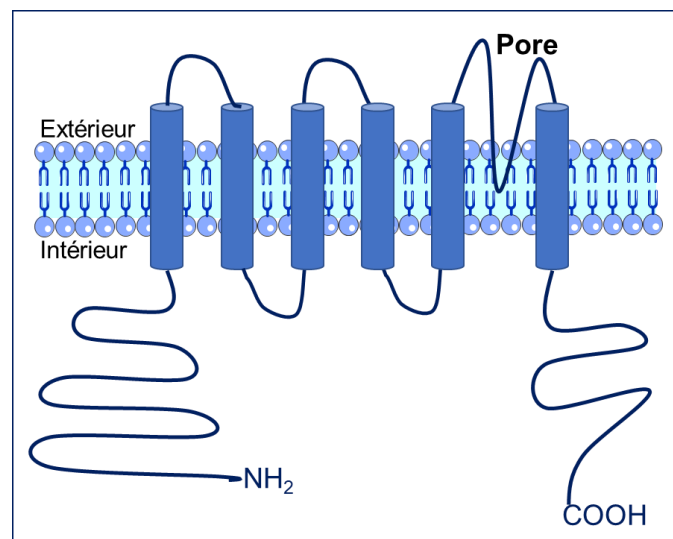


Figure I-24 : Structure de base des canaux TRP.

Les gènes *TRP* ont été suspectés pour la première fois en 1969 chez la mouche drosophile *Drosophila melanogaster*. L'étude de son système visuel a permis l'identification d'une drosophile mutante avec une déficience visuelle. Elle présentait une réponse transitoire sur l'électrorétinogramme à un stimulus lumineux au lieu d'une réponse soutenue enregistrée chez la drosophile sauvage. Ceci est à l'origine du nom « *transient receptor potential* » [215]. Ce n'est qu'en 1989 que Montel et Rubin identifièrent le gène *Trp* pour la première fois [216]. Par homologie de séquence, des gènes *TRP* ont ensuite été identifiés chez l'Homme. Les gènes *TRP* humains sont de taille allant de 11,4 à 911 kb avec un nombre variable d'exons (11 à 39) [217]. Les canaux TRP ont une structure commune de quatre sous-unités constituées de six segments transmembranaires (S1-S6). Ces dernières s'associent en homo ou hétéro tétramère. Les domaines N-terminal et C-terminal sont intracellulaires (Figure I-24).

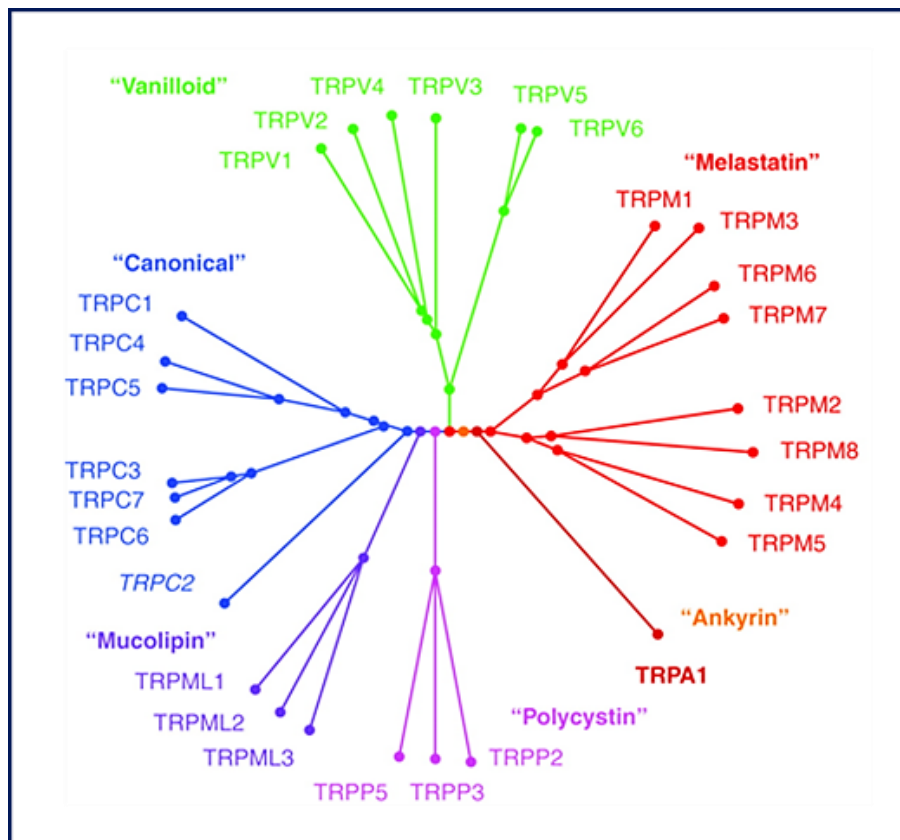


Figure I-25 : Arbre phylogénétique des canaux de la superfamille de TRP.
D'après Gees *et al.* [218].

Les canaux TRP comprennent 28 membres répartis en 6 familles en fonction de leur homologie de structure chez les mammifères (Figure I-25). Nous avons les familles suivantes : TRPC pour Canonical (7 membres : TRPC1 à TRPC7), TRPV pour Vanilloid (6 membres : TRPV1 à TRPV6), TRPM pour Melastatin (8 membres : TRPM1 à TRPM8), TRPP pour Polycystin (3 membres : TRPP2,3,5), TRPML pour Mucolipin (3 membres : TRPML1 à TRPML3) et TRPA pour Akryrin (1 membre). A ces familles s'ajoute la famille TRPN, pour *No-mechano-potential* (NOMPC-like) qui n'est pas présente chez les mammifères [219].

b) Les canaux TRP dans le cœur

Les canaux TRP sont différentiellement exprimés dans les différentes régions et types cellulaires cardiaques où ils exercent plusieurs fonctions notamment dans le développement, l'activité électrique et la contraction du cœur.

Différents canaux TRPC sont exprimés dans le nœud sinusal, les oreillettes, les cellules des fibres de Purkinje et les fibroblastes cardiaques [220]. Le canal TRPC1 participe au remodelage hypertrophique du ventricule chez le rat. Le canal TRPC3 quant à lui, participe à l'activité pacemaker et à la contraction du cœur. En fin, le canal TRPC6 participe au remodelage hypertrophique et la cicatrisation [220].

Concernant les canaux TRPV, ils sont exprimés dans les ventricules, les oreillettes et les fibroblastes cardiaques à l'exception des canaux TRPV3 et TRPV5. Le canal TRPV1 est connu pour participer à la contraction cardiaque. Tandis que le canal TRPV2 est impliqué dans l'activité contractile du cœur. Et puis le canal TRPV4 joue lui un rôle dans la production des ROS ainsi que la contraction médiée par l'hypotonie et la valvulogénèse [220].

Quant aux canaux TRPM, ils sont exprimés dans les ventricules, les oreillettes, le nœud sinusal, les fibres de Purkinje et les fibroblastes cardiaques. Le canal TRPM2, pour sa part, régule la fonction mitochondriale des cardiomyocytes. Les canaux TRPM4 et TRPM7 participent à l'activité pacemaker du cœur et le développement embryonnaire du ventricule. De plus, le canal TRPM4 participe aussi à la modulation du potentiel d'action (PA) comme nous le détaillerons plus tard. Pour ce qui est du canal TRPM7, il participe également à la prolifération des fibroblastes.

En outre, la présence des canaux TRPP1 et TRPP3 a été montrée dans les ventricules où le TRPP1 participe aux variations transitoires du calcium et à l'homéostasie calcique. Puis le canal TRPP2 est impliqué dans le développement de la valve bien que son expression n'ait pas été rapportée dans le cœur adulte [220]. Alors que, le canal TRPA1 a été identifié dans les ventricules des souris et les fibroblastes cardiaques humains. Il est impliqué dans la contraction et la relaxation du ventricule [220].

Par ailleurs, les canaux mécanosensibles TRPP2 et TRPV4 sont impliqués dans le développement de la valve. En réponse aux flux oscillatoires, Ces canaux génèrent une réponse calcique dans les cellules endocardiques qui participent à la morphogenèse de la valve. En effet, l'absence de TRPP2 ou TRPV4 entraîne des malformations de la valve [221]. De plus, une récente étude a montré que les VICs porcines expriment un canal TRPV4 fonctionnel. Il joue un rôle dans la prolifération des VICs et leur activation en VICs myofibroblastiques. [222].

Les mécanismes de sous ou surexpression des canaux TRP sont impliqués dans différents processus pathologiques cardiaques tels que les troubles de conduction, l'hypertrophie, la fibrose et l'insuffisance cardiaque [220]. Par exemple, les canaux TRPC1/3 et TRPM7 sont surexprimés chez les patients atteints de fibrillation atriale [223]–[226]. L'expression protéique des canaux TRPC3/4/6, TRPM4 et le transcrit de TRPM3 augmentent dans l'hypertrophie cardiaque [220], [227]–[231]. La délétion simultanée des gènes *Trpc3* et *Trpc6* protège du remodelage induit par l'hypertension montrant leur implication dans la pathologie [232]. Le canal TRPC3 participe au remodelage hypertrophique pathologique via l'influx calcique et en régulant les canaux calciques voltage-dépendants de type L ($Ca_v1.2$). Il participe aussi à la production des ROS [227], [233], [234]. Enfin, l'influx de calcium à travers les canaux TRPA1, TRPC3/6 et TRPV4 participe à la différenciation des fibroblastes ventriculaires. Alors que les canaux TRPC3, TRPM7 et TRPV4 participent à la prolifération et la différenciation des fibroblastes atriaux [220].

2. Caractéristiques du canal TRPM4

Le canal TRPM4 est un canal cationique non sélectif activé par le calcium. Il est perméable aux cations monovalents avec la séquence de perméabilité suivante : $Na^+ > K^+ \gg Cs^+ > Li^+$. La conductance unitaire du canal TRPM4 est d'environ 25 pS [235], [236]. L'expression du canal TRPM4 est assez ubiquitaire. Parmi les tissus avec la plus forte expression nous trouvons le cœur et le rein [236].

Le canal TRPM4 participe à plusieurs fonctions en régulant le potentiel de membrane et l'homéostasie calcique dans les cellules excitables et non excitables. Son rôle principal serait la régulation de l'influx calcique [236], [237]. Dans les cellules non excitables, le canal TRPM4 contrôle cet influx par son action dépolarisante qui modifie le gradient électrochimique du calcium et active les canaux voltage-dépendants. Tandis que dans les cellules excitables comme les neurones et les cardiomyocytes, le canal TRPM4 module la fréquence et/ou la durée du potentiel d'action [236].

Le gène *TRPM4* fut cloné pour la première fois chez l'homme par Launay et collaborateurs en 2002 [236]. Il est constitué de 25 exons qui s'étendent sur 54 kb chez l'Homme et 31 kb chez la souris. La région transmembranaire est codée par les exons 15 à 20. Le gène *TRPM4* est localisé sur le chromosome 19 et code une protéine de 1214 acides aminés pour un poids moléculaire de 137 kDa chez l'Homme (Figure I-26) [236]. Alors qu'il est localisé sur le chromosome 7 chez la souris codant une protéine de 1213 acides aminés [238] et sur le chromosome 1 chez le rat codant une protéine de 1203 acides aminés [239]. Plusieurs variants de ce gène existent suite à l'épissage alternatif. Chez l'Homme, il a été rapporté une isoforme longue hTRPM4b et une isoforme courte hTRPM4a qui possède 174 acides aminés en moins en N-terminal. Chez le rat, l'isoforme rTRPM4a est non fonctionnelle. Elle ne possède pas la partie N-terminale de l'isoforme rTRPM4b qui est l'orthologue de l'isoforme humain TRPM4b [239]. Il est maintenant admis que c'est l'isoforme TRPM4b qui est fonctionnelle. Ainsi, dans l'ensemble de la thèse, « TRPM4 » se réfèrera à cette isoforme. Le poids moléculaire d'un homotétramère du canal TRPM4 est d'environ 500 kDa pour une taille de 150x100x100 Å [240].

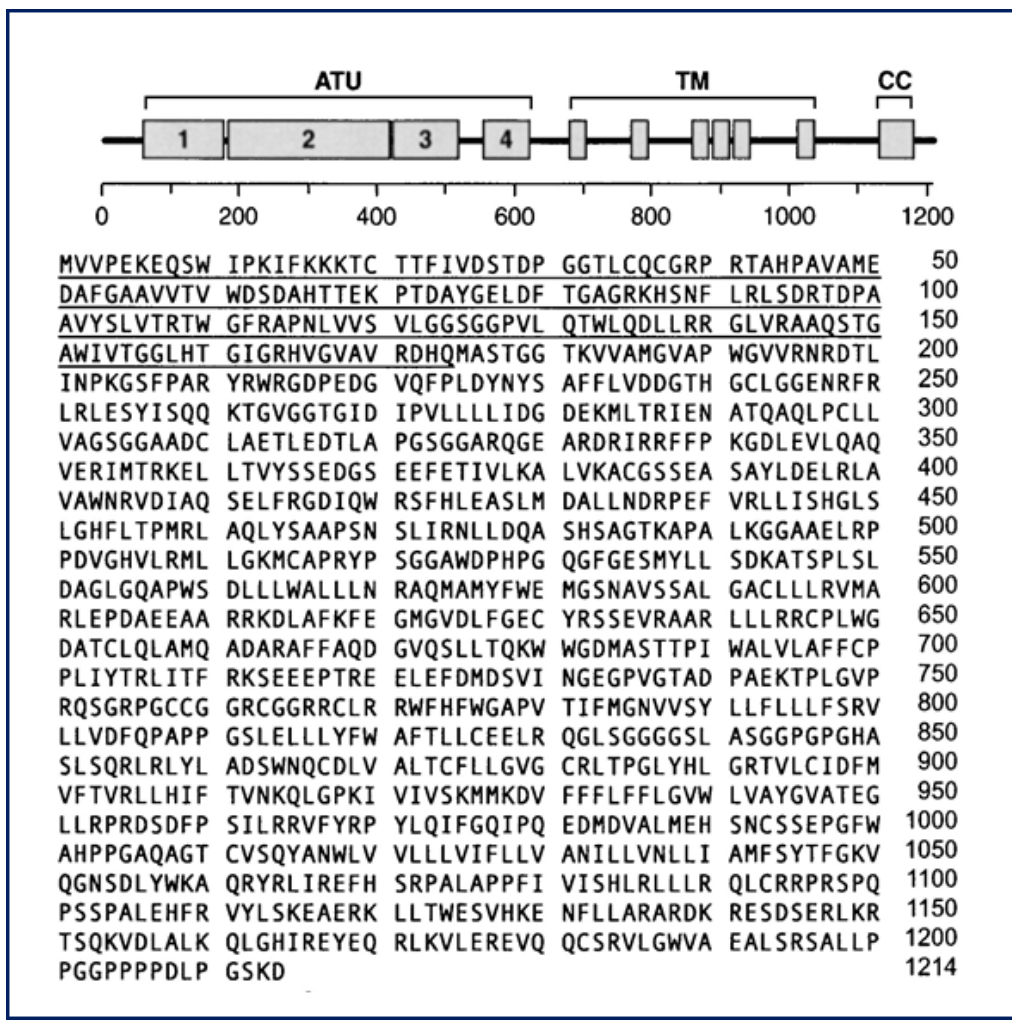


Figure I-26 : Séquence des acides aminés de la protéine TRPM4 humaine

En haut, représentation du canal TRPM4. ATU : domaine N-terminal, TM : domaine transmembranaire, CC : domaine C-terminal. D’après Launay *et al.* [236].

3. Structure du canal TRPM4

L’évolution des techniques de microscopie électronique, en particulier le cryomicroscopie électronique, a permis de déterminer avec précision la structure du canal TRPM4. Ce dernier possède une structure générale commune à tous les TRP, en plus des structures qui lui sont propres. Il possède six domaines transmembranaires formés par des hélice α hydrophobes (Figure I-27).

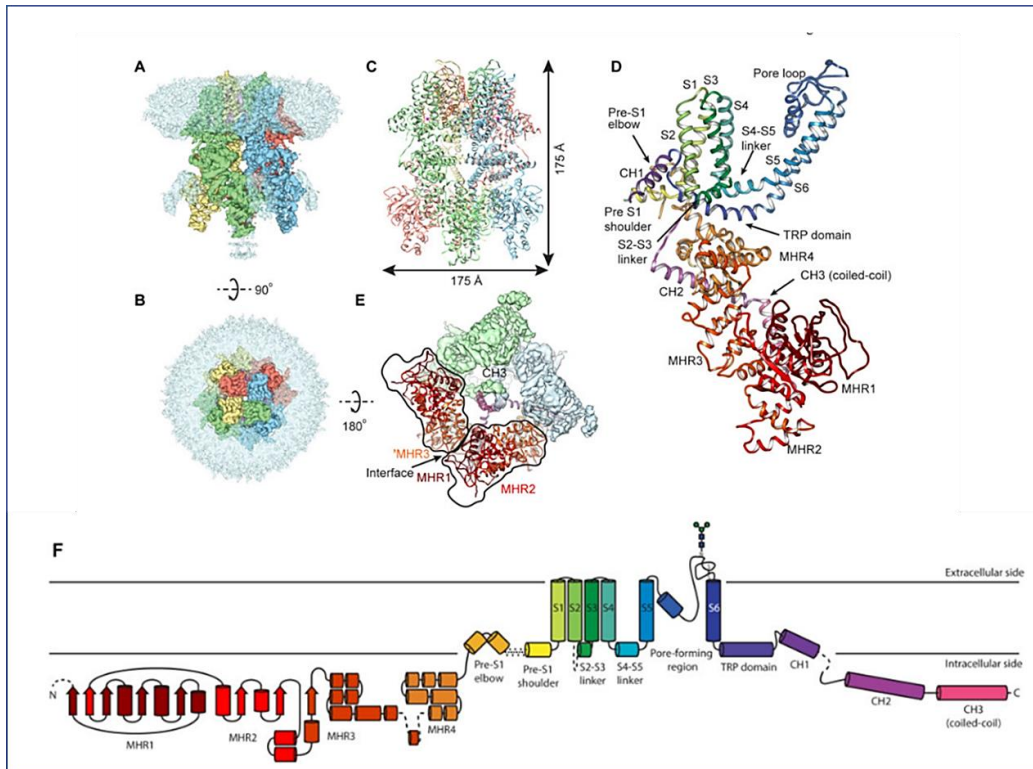


Figure I-27 : Structure du canal TRPM4 humain

Canal hTRPM4 tétramérique où chaque sous-unité est colorée différemment. **A** : vue latérale, **B** : vue supérieure. **C** : Modèle atomique de hTRPM4 tétramérique. **D** : monomère hTRPM4b. **E** : vue inférieure. **F** : Représentation schématique des principaux composants de hTRPM4b. D'après Autzen *et al.* [241].

Le domaine N-terminal comprend quatre régions d'homologie des TRPM (MHRs). Ce sont des régions conservées dans la sous famille de TRPM. Le domaine N-terminal participe à la régulation du canal par l'ATP et le decavanate [240]. Le domaine C-terminal comprend une hélice faisant le pont entre le domaine TRP et le domaine conservé *coiled-coil* (25 acides aminés). Le domaine TRP est formé par deux hélices : une longue reliée au domaine S6 et une courte reliée au domaine C-terminal (Figure I-27). Il se lie à la boucle S4-S5 par des liaisons hydrogènes et peut interagir avec le domaine N-terminal via une liaison polaire. Il participe à l'activation du canal et à sa modulation allostérique. En outre, le domaine *nucleotide binding site* en N-terminal et le domaine *coiled coil* en C-terminal participent à l'assemblage du canal en tétramère [240].

Le pore du canal contient une longue boucle, entre les domaines S5 et S6, formée des 66 résidus d'acides aminés 951 à 1,016. Il comprend une partie hydrophile correspondant à l'hélice α du pore suivie par une région hydrophobe contenant le domaine $^{981}\text{EDMDVA}^{986}$ qui

est le filtre de sélectivité du canal (Figure I-28) [242], [243]. De plus, la présence de 2 arginines chargés positivement (Arg892 et Arg905) dans le domaine S4 et la boucle S4-S5 contribue à la sensibilité du canal au voltage [244].

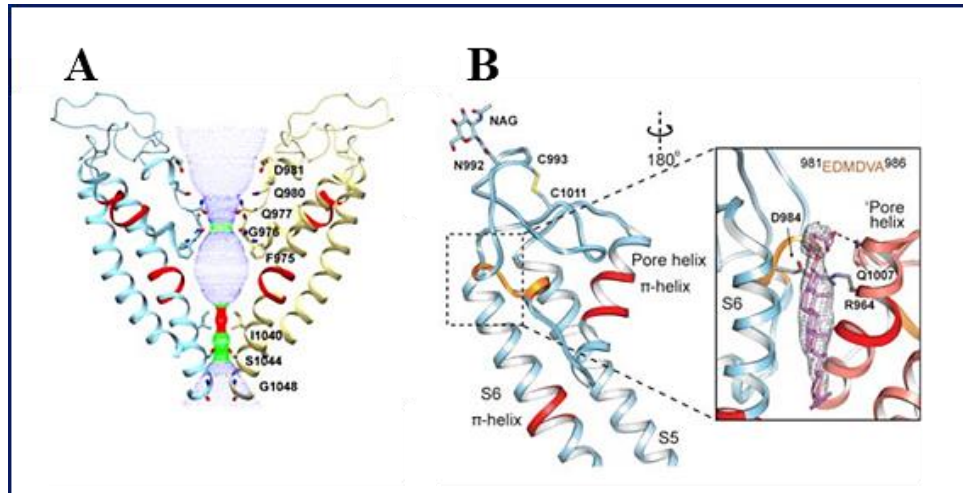


Figure I-28 : Pore du canal TRPM4

A : pore du canal entre deux monomères opposés représentés par des rubans colorés en jaune et bleu.
 B : vue rapprochée de l'hélice et de la boucle du pore. Le filtre de sélectivité putatif est en orange.
 D'après Autzen *et al.* [244].

4. Régulation du canal TRPM4

a) Régulation physiologique

➤ Le voltage

Le canal TRPM4 est un canal voltage-dépendant plus actif dans des potentiels positifs. Il est donc activé par la dépolarisation de la membrane [235]. En outre, le canal TRPM4 est activé par la chaleur (*heat-activated channel*). A un voltage de +25 mV, le canal TRPM4 a un Q_{10} de 8,5 entre 15 °C et 25 °C. L'augmentation de la température déplace la courbe de la probabilité d'ouverture du canal vers des potentiels négatifs [245].

➤ Calcium et calmoduline

Le canal TRPM4 est activé par le calcium intracellulaire avec une concentration de demi-efficacité (EC50) entre 0,5 et 1 μ M [236], [246]. Cette sensibilité au calcium est modulée par les phosphoinositides membranaires, la calmoduline et l'ATP [237]. Les quatre sites de

fixation du calcium sont localisés près de l'hélice S3 transmembranaires (Glu828, Gln831, Asn865, and Asp868) [241], [247], [248]. Le canal TRPM4 possède aussi cinq sites de liaison à la calmoduline (deux en N-terminal et trois en C-terminal) [237]. La sensibilité du canal au calcium est également modulée par la phosphorylation par la PKC (Figure I-29). La phosphorylation de la Ser1152 et la Ser1145 augmente cette sensibilité et contribue donc à l'activation du canal [237].

➤ Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2)

Le PIP2 module l'activation du canal TRPM4 en augmentant sa sensibilité au calcium et en déplaçant les potentiels d'activation du canal vers des valeurs plus négatives, avec une EC₅₀ entre 5,1 et 5,8 μM [246], [249]. Il existe plusieurs sites de fixation du PIP2 sur le canal TRPM4 dont deux sur la première région d'homologie putatif de pleckstrin situé à l'extrémité C-terminale et sur la région pré-S1 du domaine N-terminal [246], [250].

➤ Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le canal TRPM4 est modulé par le H₂O₂. Sa cible sur le canal serait la Cys1093 qui, après réduction, augmenterait la fixation de la calmoduline diminuant ainsi la désensibilisation du canal [251]. L'effet du H₂O₂ sur la désensibilisation du canal TRPM4 est observé dès une concentration de 50μM dans les cellules HEK surexprimant le canal [251]. L'activation du canal induite par H₂O₂ a également été décrite dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine [252]. En plus de son effet sur l'activation du canal, l'application d'une concentration de 200μM de H₂O₂ augmente l'expression protéique TRPM4 dans ces cellules [253].

➤ Tissue plasminogène activator (tPA)

Le tPA active les canaux SUR1-TRPM4 dans les cellules endothéliales cérébrales murines. Cette activation est dépendante du calcium, du canal TRPC3 et de la plasmine [254]. En outre, le tPA induit une expression de *novo* des canaux SUR1-TRPM4 en réponse à l'activation du NFκ-B (Figure I-30) [254].

➤ Les nucléotides intracellulaires :

Dans les cellules HEK transfectées avec le gène *TRPM4*, il a été montré que l'activité du canal est inhibée par les nucléotides intracellulaires suivants : l'ATP (IC₅₀ = 2μM), l'ADP

($IC_{50} = 2,2\mu M$), l'AMP et l'AMP-PNP (IC_{50} de 2-19 μM). L'activité du canal est également inhibée par une forte concentration d'adénosine ($IC_{50} = 630 \mu M$). Alors que la GTP, l'UTP et la CTP n'ont aucun effet [255]. Les résultats similaires ont été observés sur des canaux natifs dans différents types cellulaires : les cardiomyocytes ventriculaires différenciés de rat [256], les cardiomyocytes d'atrium droit humain [257], les cardiomyocytes du ventricule gauche de rat spontanément hypertendu [231] et les cellules du nœud sino atrial murin [258]. Par ailleurs, l'effet de l'ATP est dépendant du magnésium (MgATP) [255]. Le MgATP joue un rôle important en maintenant la sensibilité du canal au calcium [237]. L'activation du canal TRPM4 par le MgATP serait dû soit à sa fixation directe sur le canal, soit à la genèse des substrats pour les phosphatidylinositol-4 kinases qui restaurent la quantité de PIP2 membranaire nécessaire à l'activation du canal (Figure I-29) [246], [249].

➤ Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote inhibe un courant cationique non sélectif semblable à celui de TRPM4 dans les cellules endothéliales macrovasculaires à une concentration de 10 à 30 μM [259]. Cette inhibition est voltage-dépendante. Néanmoins, le NO n'agit pas directement sur le canal TRPM4. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, l'inhibition du canal par le NO est médiée par l'intermédiaire du substrat de la protéine G (PKG). Cette inhibition est associée à celle du récepteur de l'inositol 1,4,5-trisphosphate qui diminue la libération de calcium et par conséquent l'activité de TRPM4 [260].

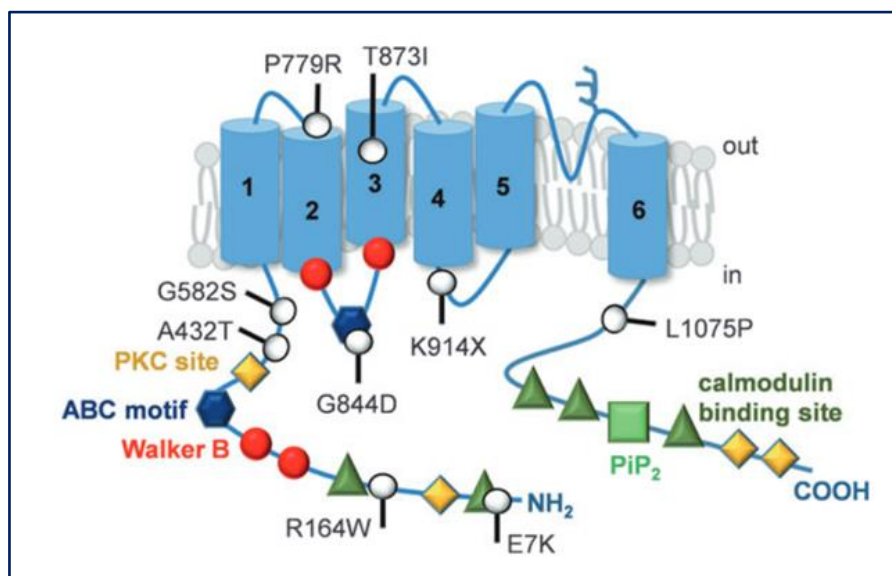


Figure I-29 : Sites de fixation des modulateurs et quelques mutations connues du canal TRPM4.
D'après Guinamard *et al.* [261]

b) Pharmacologie

➤ BTP2

Le BTP2 (3,5-bis(trifluorométhyl)pyrazole) ou YM-58483 augmente l'activité du canal TRPM4 (Figure I-30). Il augmente le courant natif TRPM4 des cellules de Jurkat (lignée immortalisée de lymphocyte T CD4 humain) de façon dose dépendante avec une IC_{50} de 8 nM [262]. Cependant, le BTP2 est un inhibiteur des SOC (*store-operated channel*) tels que ORAI, TRPC3 et TRPC5 à une concentration entre 0,5 et 4 μ M [263].

➤ Diazoxide

Le diazoxide est un traitement de l'hypoglycémie du fait de son activation des canaux potassiques K_{ATP} [264]. Le canal TRPM4 peut former des canaux hétéromères avec SUR1, une sous-unité des canaux K_{ATP} . Ce qui explique l'effet du diazoxide sur les canaux TRPM4-SUR1 (Figure I-30). Il augmente considérablement les courants TRPM4-SUR1 (environ 15 fois) dans les cellules COS-7. Cependant, le diazoxide n'a aucun effet sur la forme homotetramère du canal TRPM4 [265].

➤ Decavanate

Le decavanate est la forme décavère du vanadate (Figure I-31). Il interfère avec le site de fixation de l'ATP sur ses transporteurs protéiques. Le decavanate module l'activité du canal TRPM4 en inhibant la fermeture du canal voltage-dépendant avec une EC_{50} de 1,9 μ M. Le site de fixation du decavanate se situe au niveau d'une séquence hautement chargée positivement 1136 RARDKR en C-terminal [267]. Le decavanate peut être utile pour différencier le canal TRPM4 du canal TRPM5 sur lequel il n'a aucun effet.

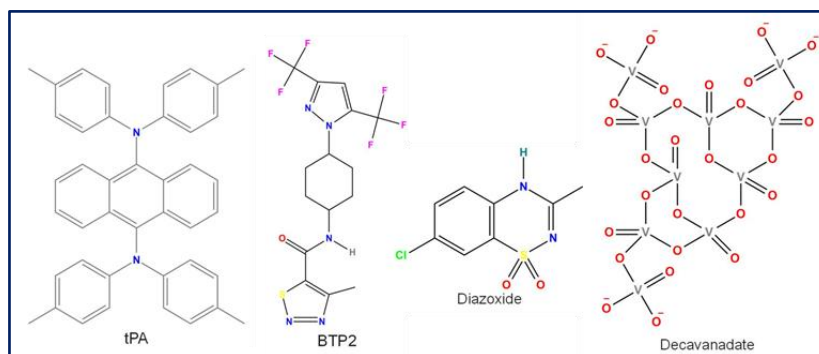


Figure I-30 : Formules chimiques des molécules activant le canal TRPM4

D'après Kovac *et al.* [263].

➤ 9-phénanthrol

Le 9-phenanthrol est l'inhibiteur du canal TRPM4 le plus utilisé actuellement pour étudier le rôle du canal (Figure I-31). L'effet du 9-phénanthrol sur le courant TRPM4 fut décrit pour la première fois en 2008 par Grand et collaborateurs [266]. Il inhibe le courant TRPM4 surexprimé dans les cellules HEK avec une IC_{50} comprise entre 17 et 20 μM en configuration de patch clamp cellule entière et unitaire *inside-out*. Son effet est réversible et indépendant du voltage. De plus, le 9-phénanthrol n'a pas d'effet sur le canal TRPM5 [266].

➤ Spermine

La spermine est une polyamine (Figure I-31) qui inhibe le canal TRPM4 humain surexprimé dans les HEK avec une IC_{50} de 61 μM [255]. Elle bloque également les canaux TRPM4 et TRPM5 murins avec une IC_{50} de 35 et 37 μM [268]. La spermine se lierait aux résidus chargés positivement Glu981, Asp982, Asp984, Glu988, et Glu996 [255].

➤ Acide flufénamique

L'acide flufénamique est un anti-inflammatoire non stéroïdien. Avant la découverte du 9-phenanthrol, il a été largement utilisé comme un bloqueur du canal TRPM4 en expérimentation (Figure I-31). L'acide flufénamique n'est pas sélectif du canal TRPM4. Son IC_{50} pour le canal TRPM4 est comprise entre 3 et 6 mM. Toutefois, il inhibe aussi les courants chlorures induits par le GABA ou dépendant du voltage à une IC_{50} comprise entre 4 et 20 mM [231], [268].

➤ Glibenclamide

Le glibenclamide est un antidiabétique agissant sur les canaux potassique K_{ATP} . Il a également un effet inhibiteur sur le canal TRPM4 (Figure I-31) [258]. Cependant, il a un effet plus important sur le canal TRPM4-SUR1 avec une IC_{50} de 850 nM [265].

➤ CBA

Le CBA (4-chloro-2-[[2-(2-chlorophenoxy) acetyl] amino] benzoic acid) est une nouvelle molécule utilisée comme inhibiteur du canal TRPM4 (Figure I-31). Le CBA aurait une bonne sélectivité et serait 15 fois plus efficace que le 9-phénanthrol avec une IC_{50} entre 1 et 2 μM [269]. Deux autres composés ont été décrits comme des inhibiteurs efficaces du canal TRPM4 : le NBA (4-chloro-2-[[2-(2-chlorophenoxy) acetyl] amino] benzoic acid) et le LBA

(4-chloro-2-(2-(4-chloro-2-methylphenoxy) propanamido) benzoic acid) [269]. Comparés au CBA, le NBA et le LBA semblent être plus efficaces sur les canaux TRPM4 exprimés dans les cellules HEK. Les valeurs de leurs IC₅₀ sont respectivement de 0,4 et 1,6 µM.

Une étude a récemment comparé les effets du CBA, NBA et du 9-phénanthrol.; Le NBA est apparu comme le meilleur composé en réduisant l'activité des canaux TRPM4 humains et murins surexprimés de manière stable avec une efficacité similaire (valeurs IC₅₀ entre 0,1 et 0,2 mM) lors d'une application extra- et intracellulaire [270].

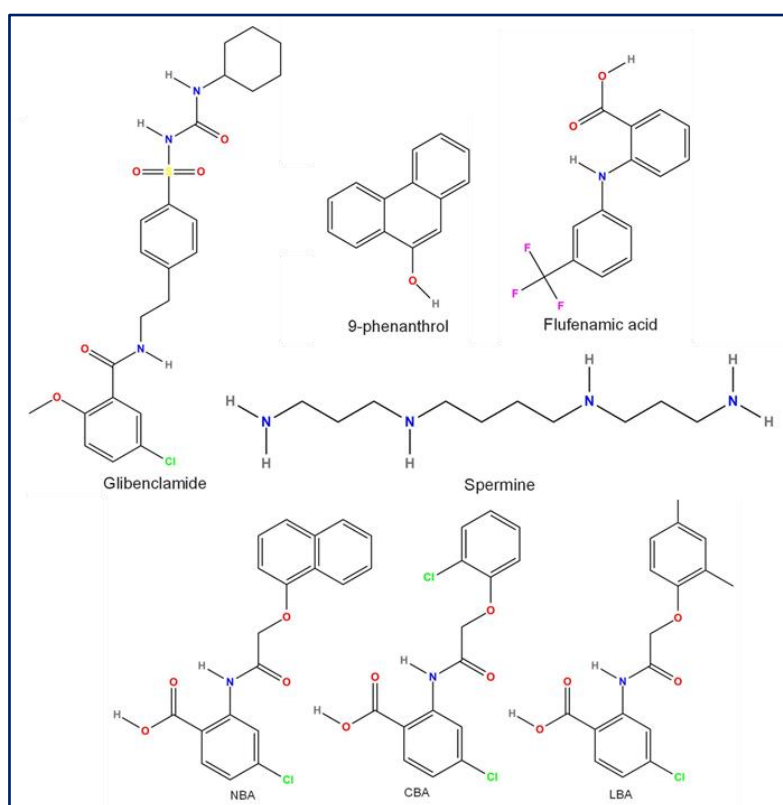


Figure I-31 : Formules chimiques des molécules inhibant le canal TRPM4
D'après Kovac *et al.* [263].

5. Rôles du canal TRPM4 dans le cœur

Le canal TRPM4 est fortement exprimé dans les tissus cardiaques mais n'a pas une répartition uniforme. Ainsi dans l'ordre décroissant du niveau d'expression, le canal TRPM4 est exprimé dans les fibres de Purkinje, le nœud sinusal, les oreillettes et les ventricules. De plus, une récente étude a montré l'expression du canal dans les cellules interstitielles valvulaires [271].

a) Rôle physiologique

➤ Nœud sinusal

L'expression protéique et celle du transcrit du canal TRPM4 ont été détectées dans le nœud sinusal chez la souris, le rat ainsi que le lapin. Par ailleurs, le canal TRPM4 fonctionnel a été enregistré chez la souris [258], [272], [273]. Hof et collaborateurs ont démontré l'implication du canal dans l'automatisme cardiaque. En effet, l'activité spontanée d'oreillettes droites isolées de souris sauvages est diminuée par le 9-phéanthrol (inhibiteur du canal TRPM4) alors que cette molécule n'a aucun effet sur les oreillettes de souris *Trpm4 knock-out* (KO). De plus, le 9-phéanthrol diminue la pente de dépolarisation diastolique sans affecter les autres paramètres du potentiel d'action du nœud sinusal chez le lapin [272].

➤ Fibres de Purkinje

Le canal TRPM4 est fortement exprimé dans les cellules des fibres de Purkinje humaines et bovines [274], [275]. L'implication du canal TRPM4 dans le PA des fibres de Purkinje a été exploré par Hof et collaborateurs. Ils ont démontré que le 9-phéanthrol diminue la durée du PA des fibres de Purkinje du lapin [276].

➤ Atrium

La présence du canal TRPM4 fonctionnel a été montré dans les cardiomyocytes atriaux de rat, de souris et de l'homme [257], [277], [278]. L'inhibition du canal TRPM4 par le 9-phéanthrol ou l'acide flufénamique réduit la durée du PA des cardiomyocytes atriaux issus des souris sauvages. Cependant, le 9-phéanthrol n'a aucun effet sur le PA atrial des souris *Trpm4 knock-out* [278]. De plus, le PA atrial des souris *Trpm4 knock-out* est plus court que celui des souris sauvages [272], [278], [279]. Le canal TRPM4 est également impliqué dans la réponse aux stress de cisaillement des cellules de l'atrium de rat via l'activation du récepteur de l'inositol 1,4,5-trisphosphate et la libération du calcium [280]. En outre, il médie la croissance des fibroblastes atriaux murins. En effet, l'expression de la protéine et du courant TRPM4 ainsi que celle de l' α -SMA augmentent avec le temps et le développement de fibroblastes atriaux humains et murins en culture. Cette croissance est moins importante chez les fibroblastes de souris *Trpm4 knock-out* ou en présence du 9-phéanthrol chez les souris sauvages [281].

➤ Ventricule

Les résultats obtenus sur le rôle du canal TRPM4 dans l'activité électrique du ventricule sont contradictoires. Certaines études rapportent des courants TRPM4 observés sur les cardiomyocytes ventriculaires de rat en culture [256], [257]. De plus, il est présent dans le ventricule droit des patients pédiatriques présentant la tétralogie de Fallot et dans le ventricule de la souris [282], [283]. Toutefois, la participation du canal au PA des cellules ventriculaires est controversée puisque certaines études ne rapportent pas de différences entre le PA des cardiomyocytes ventriculaires issus des souris sauvages et *Trpm4 knock-out* [272], [278]. Alors que d'autres études montrent que cette durée est plus courte chez les souris *Trpm4 knock-out* [284].

b) Rôle physiopathologique

Le canal TRPM4 est impliqué dans plusieurs processus pathologiques tels que l'hypertrophie, les troubles de conduction et les lésions d'ischémie-reperfusion.

➤ Troubles de conduction

Des études ont identifié des mutations du gène *Trpm4* liées à des pathologies cardiaques, particulièrement des troubles de conduction. Ce qui démontre le rôle important du canal TRPM4 dans l'activité électrique du cœur. Ces mutations conduisent à des gains ou pertes de fonction. La mutation de substitution du glutamate 7 par une lysine (E7K) conduit à un gain de fonction du canal en réduisant l'endocytose et en augmentant l'intensité des courants TRPM4 [275]. Le mutant E7K autosomique dominant est responsable d'un bloc cardiaque progressif familial de type I. Un autre mutant gain de fonction A432T est présent dans les blocs atrioventriculaires congénitaux et infantiles. L'intensité du courant TRPM4 de ce mutant est faible par rapport à celle du canal TRPM4 sauvage [285]. Certains patients atteints du syndrome de Brugada présentent des mutations du canal TRPM4, soit des mutations gains de fonction (T878I, L1075P), soit des mutations pertes de fonction (P779R, K914X et G844D) [286], [287]. De plus, Hof et collaborateurs ont identifié quatre mutations du canal TRPM4 chez 2,2% d'une cohorte de patients atteints du syndrome QT long (Figure I-29) [288].

➤ Remodelage et hypertrophie cardiaque

Différentes études ont démontré l'implication du canal TRPM4 dans le remodelage et l'hypertrophie cardiaque [272], [289]–[291]. L'expression du transcrit et le courant du canal TRPM4 sont plus importants dans les cellules du ventricule hypertrophié des rats spontanément hypertendus comparé aux rats Wistar-Kyoto contrôles [231]. Le canal TRPM4 favorise également l'hypertrophie du ventricule gauche. Cette hypertrophie est induite par la surcharge de pression puisque celle-ci est observée chez les souris sauvages mais pas chez les souris *Trpm4 knock-out* [292].

A l'inverse, le canal TRPM4 a un effet protecteur sur l'hypertrophie induite par l'angiotensine II. Les souris *Trpm4 knock-out* développent une hypertrophie plus importante que les souris sauvages [293]. De même, l'hypertrophie du ventricule droit est plus importante chez les rats *Trpm4 knock-out* dans un modèle d'hypertension pulmonaire [283]. Le canal TRPM4 participe également au remodelage cardiaque après un entraînement d'endurance. En effet, une amélioration de la fonction cardiaque est observée en réponse à l'entraînement d'endurance chez les souris sauvages alors que les souris *Trpm4 knock-out* n'y répondent pas [291]. De plus, Demion et collaborateurs ont observé une hypertrophie excentrique du ventricule gauche chez les souris *Trpm4 knock-out* adultes comparées aux souris sauvages [272].

➤ Ischémie-reperfusion

Des études ont démontré l'implication du canal TRPM4 dans les lésions d'ischémie-reperfusion. L'inhibition du canal TRPM4 par le 9-phénanthrol réduit la fréquence des post-dépolarisations précoces provoquées par l'hypoxie et la réoxygénation du ventricule droit isolé de souris [294]. Des résultats similaires ont été observés chez le rat où le 9-phénanthrol améliore la contraction du cœur pendant la reperfusion et réduit la zone de l'infarctus induite par ligature de coronaire [295]. En outre, le traitement des cellules H9c2 issues des cardiomyocytes du ventricule de rat par le 9-phénanthrol prévient les lésions causées par les ROS produites après exposition au H₂O₂ [296]. Ces résultats montrent un rôle délétère du canal TRPM4 lors du processus d'ischémie-reperfusion myocardique.

➤ Lésions endothéliales

Certaines études ont démontré le rôle du canal TRPM4 dans les lésions des cellules endothéliales. Par exemple, les cellules endothéliales vasculaires surexpriment le canal TRPM4 sous l'influence de divers facteurs de lésions endothéliales. L'activation du canal TRPM4 entraîne une dépolarisation de la membrane grâce à l'influx de sodium. L'augmentation de la concentration intracellulaire du sodium et du chlore augmente la pression osmotique, ce qui attire l'eau dans la cellule et provoque ainsi leur gonflement et éclatement [297].

En outre, l'expression du canal TRPM4 est fortement augmentée dans les cellules endothéliales des rats hypertendus suite à un régime riche en sel [253]. Son expression est également augmentée dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en condition hypoxique et ischémique [298]. De plus, les ROS exogènes régulent à la hausse l'expression du canal entraînant l'apoptose des cellules endothéliales. L'utilisation du 9-phénanthrol inhibe ce processus [253]. Enfin, le canal TRPM4 est aussi impliqué dans les lésions endothéliales vasculaires induites par les lipopolysaccharides (LPS). Comme évoqué précédemment, les LPS entraînent la mort via la production des ROS [299], [300].

6. TRPM4 et différenciation Cellulaire

Peu d'études ont exploré le rôle du canal TRPM4 dans la différenciation des cellules cardiaques. Les résultats obtenus diffèrent selon les types cellulaires et les mécanismes étudiés.

Guinamard et collaborateurs ont rapporté que l'activité du canal cationique non sélectif activé par le calcium (*TRPM4-like*) augmente avec le temps dans les cardiomyocytes du rat adulte en culture. Initialement absente dans les cellules fraîchement isolées, l'activité du canal mesurée en patch clamp augmente avec la dédifférenciation de ces cellules [256]. Récemment, Simard et collaborateurs ont démontré que l'expression et l'activité du canal TRPM4 augmentent dans les fibroblastes cardiaques humains et murins en culture. En parallèle, la taille des cellules et l'expression de l' α -SMA (un marqueur du phénotype myofibroblastique) augmentent également. L'inhibition du canal par le 9-phénanthrol réduit la croissance cellulaire et l'expression de l' α -SMA de ces cellules. Ces résultats démontrent que le canal TRPM4 participe à la transition des fibroblastes cardiaques en myofibroblastes. Cette observation a été l'un des points de départ de notre étude [281].

En dehors des cellules cardiaques, le canal TRPM4 régulerait aussi le phénotype de cellules endothéliales. L'inhibition du canal TRPM4 par un siRNA préserve le phénotype endothélial des cellules en inhibant leur différenciation en fibroblaste induite par le TGF- β [301]. Une étude transcriptomique de l'expression de gènes durant la différenciation des adipocytes 3T3-L1 a montré que l'expression génique des canaux TRP varie (à la hausse ou à la baisse) au cours de la différenciation des adipocytes. Quant au canal TRPM4, son expression diminue dans les adipocytes différenciés [302]. Une autre étude a montré l'implication du canal TRPM4 dans la différenciation des cellules souches du follicule dentaire (DFSCs) chez le rat. La suppression du canal avec des shRNA favorise la différenciation des DFSCs en ostéoblaste et inhibe leur différenciation en adipocytes. Par conséquent, le canal TRPM4 favoriserait le phénotype adipocytaire au lieu d'un phénotype ostéogénique [303].

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que le canal TRPM4 est impliqué dans certains processus de différenciation. Il peut soit promouvoir la différenciation soit la réprimer ; voir même favoriser un phénotype particulier en inhibant un autre selon les types cellulaires.

PROBLEMATIQUE

II. PROBLEMATIQUE

La sténose aortique est l'une de maladie cardiovasculaire la plus fréquente. Sa prévalence est en constante augmentation avec le vieillissement de la population. La SA peut se développer suite à différents facteurs de risque dont l'exposition aux rayonnements ionisants. En effet, la radiothérapie thoracique peut entraîner dans certains cas un remodelage cardiaque à long terme. Certains patients atteints de cancer qui sont traités par la radiothérapie thoracique développent un dysfonctionnement valvulaire à type de régurgitation ou de sténose. La valve aortique est la plus touchée par ce phénomène qui se manifeste essentiellement par une fibrose tardivement associée à une minéralisation. Bien que les processus impliqués dans la physiopathologie de la SA soient en partie connus, une zone d'ombre persiste sur les mécanismes cellulaires impliqués dans le développement du remodelage valvulaire radio-induit. L'indentification des acteurs moléculaires et les processus sous-jacents permettrait de mieux comprendre sa mise en place et son développement afin de prévenir ou au moins d'atténuer le développement de cette sténose.

La SA est un processus complexe qui fait intervenir différents acteurs cellulaires et moléculaires, en particulier les cellules endothéliales et interstitielles valvulaires qui subissent un remodelage durant la pathologie. C'est particulièrement le cas des VICs qui subissent une transition vers un phénotype myofibroblastique à l'origine d'une synthèse accrue de matrice extracellulaire et donc d'une fibrose. De plus, les VICs peuvent par la suite dériver vers un phénotype ostéoblastique à l'origine de la calcification de la valve.

Les études antérieures du laboratoire ont montré l'expression importante du canal TRPM4 dans le tissu cardiaque. Si son implication a d'abord été montrée dans l'activité électrique cardiaque et ses perturbations, le canal est également impliqué dans le remodelage morphologique du cœur tout particulièrement dans les phénomènes d'hypertrophie. L'expression du canal TRPM4 n'est pas restreinte aux cardiomyocytes puisqu'il est aussi présent au niveau des fibroblastes. De plus, son expression dans ce type cellulaire semble aussi participer au remodelage cardiaque. En effet notre équipe a montré l'implication du canal TRPM4 dans la transition des fibroblastes atriaux humains et murins vers un phénotype myofibroblastique [303].

Sur la base de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que le canal TRPM4 pourrait être impliqué dans le remodelage de la valve aortique radio-induit puisque cette pathologie comprend une transition des VICs vers un phénotype myofibroblastique. Afin de tester cette hypothèse, nous avons combiné deux modèles animaux à notre disposition : d'une part un modèle murin de sténose aortique radio-induite développé au laboratoire et d'autre part un modèle de souris transgénique invalidées pour le gène *Trpm4*.

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont fait l'objet d'un article en premier auteur publié qui vous sera présenté dans la partie résultat. Il évalue, *in-vivo*, l'effet de l'irradiation de la valve aortique chez la souris. Quelques résultats complémentaires obtenue *in-vitro* sur des cellules valvulaires humaines seront également présentés.

MATERIELS ET MÉTHODES

III. MATERIELS ET METHODES

A. MATERIELS BIOLOGIQUES

1. Ethique

Notre étude a nécessité l'utilisation de souris et l'ensemble des expérimentations ont été réalisées dans le respect des règles en vigueur (directive 2010/63/EU de la commission européenne traitant des règles d'expérimentation animale). Cette étude a fait l'objet d'une autorisation du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche après validation par le comité d'éthique en expérimentation animale local. CEEA - 054 Comité d'éthique Normandie en matière d'expérimentation animale (CENOMEXA). APAFIS#23869-2020012911013146 v6.

2. Souris TRPM4 *knock-out*

Nous avons utilisé des souris invalidées de façon globale pour le gène *Trpm4* (souris *Trpm4*^{-/-}) pour étudier l'implication du canal TRPM4 dans la SA radio-induite. L'ensemble des souris utilisées dans les expérimentations ont été produites et hébergées au Centre Universitaire de Ressources Biologiques de Caen (CURB).

Les souris utilisées étaient issues de la souche C57BL/6J générée par Barbet et collaborateurs [304] ; elles nous ont été initialement fournies par le Dr Marie Demion. Les souris ont été obtenues par la délétion des exons 3 à 6 du gène *Trpm4* à l'aide de la Cre recombinase. Ces souris *Trpm4*^{-/-} sont viables et fertiles. Le phénotype cardiaque des souris *Trpm4*^{-/-} montre : une hypertrophie excentrique du ventricule gauche, un ralentissement de la propagation électrique, des troubles de conduction (bloc atrioventriculaire 1^{er} et 2^{ème} degré, syndrome de long QT) [272] et un PA atrial plus court que les souris sauvages (*Trpm4*^{+/+}) [278]. Le phénotype général de ces souris ainsi que celui d'autres modèles de souris transgéniques *Trpm4* sont donnés sur le tableau 4.

Caractéristiques du modèle animal	Stratégie de délétion	Conclusion de l'étude
Mâles C57BL/6J TRPM4 KO âgées de 12 et 32 semaines	Délétion des exons 3-6 par la Cre recombinase	TRPM4 régule la conduction et l'activité électrique cellulaire [272]
C57BL/6J TRPM4 KO âgées de 6 à 14 semaines	Délétion des exons 3-6 par la Cre recombinase	TRPM4 participe à la régulation du rythme cardiaque [273]
C57BL/6J TRPM4 KO âgées de 4 à 6 semaines	Délétion des exons 3-6 par la Cre recombinase	TRPM4 participe à la genèse du PA atrial [278]
Mâles C57BL/6J TRPM4 KO âgées de 2 mois	Délétion des exons 3-6 par la Cre recombinase	TRPM4 est impliqué dans le raccourcissement du PA atrial et les arythmies induits par l'aldostérone [279]
Mâles 129SvJ TRPM4 KO âgés de 18 à 19 semaines	Délétion des exons 3-6 par la Cre recombinase	TRPM4 serait impliqué dans l'effet inotrope ventriculaire induit par la stimulation β -adrénergique [305]
Mâles C57Bl/6N TRPM4 KO global et cardiomyocytes spécifiques âgés de 18 à 19 semaines	Délétion de l'exon 15 et 16 au niveau cardiaque	L'expression de TRPM4 est plus élevée chez les souris 129SvJ que chez les souris C57Bl/6N [305]
C57Bl6/N TRPM4 KO atteintes d'une insuffisance cardiaque ischémique sévère âgées de 21 semaines	Recombinaison par Cre-loxP	TRPM4 peut réduire la survie et la réserve cardiaque β -adrénergique dans l'insuffisance cardiaque ischémique [306]
129/SvJ TRPM4 KO	Recombinaison par Cre-loxP	TRPM4 serait un déterminant de l'effet inotrope ventriculaire induit par la stimulation β -adrénergique [284]
Mâles 129SvJ TRPM4 KO âgées de 3 à 6 mois	Recombinaison par Cre-loxP	TRPM4 limite la libération de catécholamines et peut prévenir l'hypertension induite par le tonus sympathique [307]
Mâles C57BL/6 N TRPM4 KO cardiaque spécifique âgées de 3 à 6 mois	Délétion de l'exon 15 et 16 au niveau cardiaque	TRPM4 participe au développement de l'hypertrophie pathologique [293]

Tableau 4 : Modèles de souris TRPM4 cardiaque

Tableau modifié d'après Kovacs *et al.* [263]

3. Génotypage des souris

Toutes les souris incluses dans le protocole ont été testées afin de confirmer leurs génotype TRPM4 sauvage (*Trpm4*^{+/+}) ou TRPM4 *knock-out* (*Trpm4*^{-/-}). Le génotypage consiste à déterminer la présence ou non d'un gène cible. Nous avons extrait l'ADN génomique du bout de la queue des souris. Ils ont été placés dans une solution de tampon d'extraction puis incubés durant toute la nuit à 56 °C. Après l'incubation, l'ADN a été précipité avec de l'isopropanol puis purifié avec différents lavages à l'éthanol. Les échantillons d'ADN ont été amplifiés par PCR en utilisant les amorces du tableau 5. Puis après la migration, les amplicons ont été révélés avec l'appareil imageQuant LAS 4000. Chaque souris a été testée pour le génotype *knock-out* (*Trpm4*^{-/-}) et sauvage (*Trpm4*^{+/+}). Les deux amplicons ont un poids moléculaire d'environ 500 pb. Nous avons réalisé l'expérimentation deux fois pour confirmer les résultats.

Phénotypes	Amorces : Séquences (5'→3')	
<i>Trpm4</i> ^{+/+}	Forward	CCAGGGCTCATTCCCCGCAAGGT
	Reverse	ATTCACCTGCCTCTTCCTCCCG
<i>Trpm4</i> ^{-/-}	Forward	AGCCCACTGTGTCCTATTTAG
	Reverse	ATTCACCTGCCTCTTCCTCCCG

Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées en PCR.

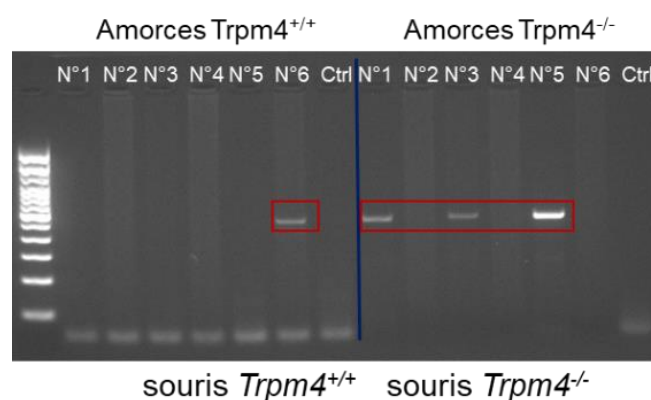


Figure III-1 : Génotypage des souris *Trpm4*^{-/-} et *Trpm4*^{+/+}.

Gel de PCR des souris N°1 à 6 ; chaque souris est testée pour les deux génotypes qui présentent des bandes à 500 pb. Ctrl : contrôle négatif avec de l'eau.

4. Cellules interstitielles valvulaires humaines

Nous avons utilisé des cellules interstitielles valvulaires humaines issues des patients ayant subi un remplacement de la valve aortique. Les VICs ont été collectées et dissociées par l'UMR S 1096 ENVI de l'Université de Rouen. Elles ont été cultivées dans des flasques T75 traitées avec de la gélatine/fibronectine dans le milieu de culture DMEM, 10% de sérum de vœux fœtal et 1% d'antibiotique (Pénicilline/Streptomycine). Une fois à confluence les cellules ont été trypsinisées et réensemencées dans des boîtes de culture (35 mm de diamètre) pour les expérimentations de patch-clamp. Elles sont utilisées jusqu'à 15 jours dans ces conditions.

B. IRRADIATION

1. Modèle murin de la sténose aortique radio-induite

Différents modèles animaux ont été mis au point pour étudier la sténose aortique. Ceux-ci utilisent le porc, le lapin, le rat et la souris. La SA peut être induite par un régime alimentaire riche en cholestérol, une manipulation génétique ou des rayonnements ionisants [308]. Cependant, l'utilisation de modèle animal dans l'étude de la SA radio-induite est peu répandue. La majorité des études évaluant les effets secondaires cardiaques de la radiothérapie utilisent des modèles où le cœur entier est irradié et quelques-unes utilisent l'irradiation spécifique d'une portion du cœur. A notre connaissance, seule une étude récente rapporte l'irradiation spécifique de l'aorte, les valves aortique et mitrale [309]. Dans cette optique, notre laboratoire a développé un modèle de sténose radio-induite de souris où la valve aortique a été spécifiquement irradiée dans le but d'étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents de ce type particulier de SA. Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé ce modèle pour étudier l'implication du canal TRPM4 dans ce processus pathologique.

2. Etapes de l'irradiation

Nous avons utilisé un micro-irradiateur Pxi225CX couplé à une tomographie par rayon X (Precision X-ray Inc, North Brandford, CT) pour irradier la valve aortique des souris. L'irradiation de la valve a nécessité 4 étapes : l'acquisition des images cardiaques par tomographie RX (scanner), le recalage des images de tomographie RX sur un atlas-IRM, la planification et l'irradiation proprement dite. Les animaux ont été placés en décubitus dorsal

dans un berceau souris chauffé, après une induction de l'anesthésie à isoflurane 5% dans un mélange d'O₂ et de N₂O pendant 30 secondes puis maintenus à 1,5% isoflurane.

➤ Tomographie au rayon X

Dans un premier temps, nous avons réalisé une tomographie RX de l'animal en utilisant un filtre aluminium de 2 mm. L'irradiateur est placé en mode tomographie RX et à l'aide du logiciel Pilot X-rad 225 nous avons réalisé une acquisition d'images au niveau du thorax de l'animal (Figure III-2).

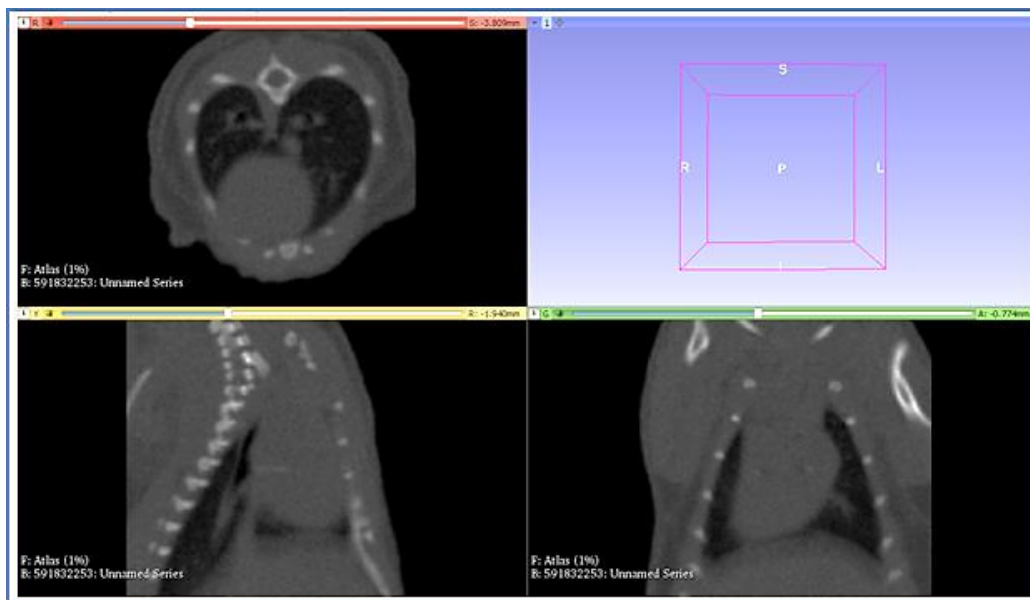


Figure III-2 : Images de tomographie au rayon X d'un cœur de souris

En haut à gauche : coupe transversale. En bas à gauche : coupe sagittale. En bas à droite : coupe coronale.

➤ Recalage des images de tomographie RX sur l'atlas-IRM

Par la suite, nous avons utilisé le logiciel 3D Slicer pour recalrer manuellement les images obtenues par tomographie RX sur un atlas-IRM du cœur conçu au laboratoire (Figure III-3) dans trois plans : coronal, sagittal et transversal [310]. L'atlas-IRM contient les segmentations de l'aorte et de la valve aortique. Nous avons utilisé la trachée et la bifurcation des bronches principales comme repères anatomiques pour recalrer les images parce que les deux structures sont visibles dans les deux types d'images (Figure III-3). A la fin du recalage, nous avons transféré les segmentations de l'aorte et de la valve aortique de l'atlas-IRM sur les images de tomographie RX (Figure III-4).

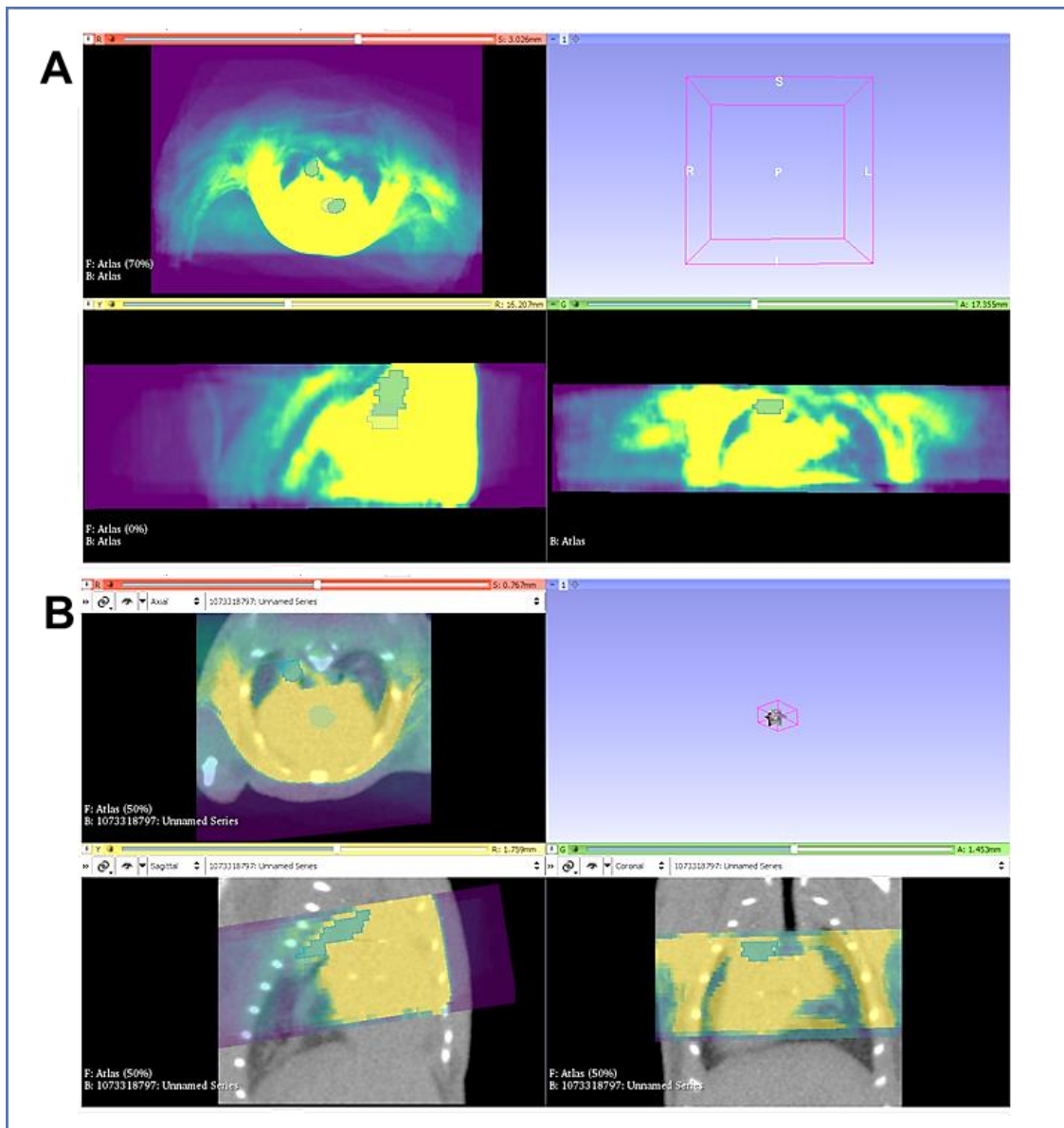


Figure III-3 : Recalage des images de tomographie RX sur l'atlas-IRM

A : Atlas IRM avec la segmentation de l'aorte en bleu et la valve aortique en vert. En haut à gauche : coupe transversale. En bas à gauche : coupe sagittale. En bas à droite : coupe coronale. **B** : Recalage des images de tomographie RX sur l'atlas-IRM. En haut à gauche : coupe transversale. En bas à gauche : coupe sagittale. En bas à droite : coupe coronale.

➤ Planification

La planification de l'irradiation s'est faite avec le logiciel SmartPlan® (Precision X-ray Inc, North Brandford, CT). Cette planification débute par l'exportation des images précédemment acquises et des segmentations de l'aorte et de la valve aortique. Puis nous avons défini différentes structures sur les acquisitions (air, os, poumon, tissus mous) en fonction des unités Hounsfield CT2MD (Computed tomography to material density). L'étape suivante est la

délimitation. Nous avons placé la segmentation de la valve aortique au centre de l'intersection des deux faisceaux dans les différents plans. Quant à l'étape de la détermination du faisceau, elle permet de calculer la dose à délivrer sur la valve, le diamètre (≤ 2 mm) et les angles d'incidence du faisceau ainsi que le collimateur le plus adapté (Beam1 : 45° , Beam2 : 315°). Chaque faisceau délivre une dose de 5 Gy. Ensuite, le logiciel calcule la dose à délivrer en fonction des tissus traversés par le faisceau pour au final déposer 10 Gy sur la valve. Cette étape est suivie de la visualisation de la distribution des doses dans l'animal (Figure III-5). L'étape finale consiste à générer un fichier contenant les paramètres d'irradiation à savoir le collimateur, les angle du faisceau, la durée d'irradiation et les coordonnées de l'isocentre pour chaque faisceau.

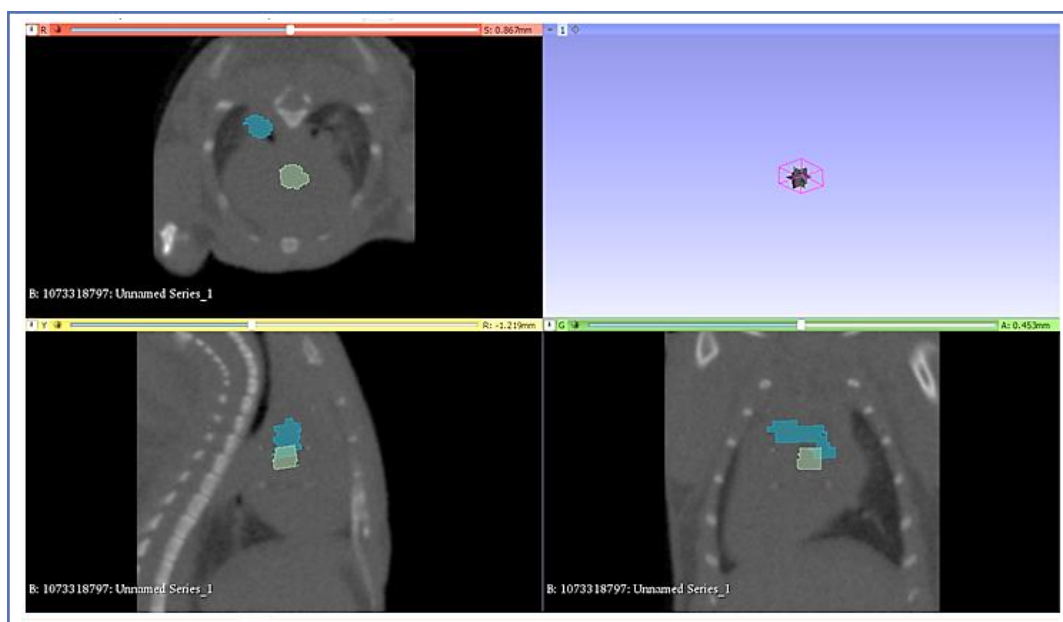


Figure III-4 : Images de tomographie RX avec la segmentation de l'aorte et de la valve. Segmentation de l'aorte en bleu et la valve aortique en vert. En haut à gauche : coupe transversale. En bas à gauche : coupe sagittale. En bas à droite : coupe coronale.

➤ Irradiation

Le fichier protocole généré précédemment est importé dans le logiciel Pilot X-Rad pour l'irradiation. Nous avons utilisé un filtre cuivre et un collimateur circulaire de 2,5 mm de diamètre pour irradier la valve aortique.

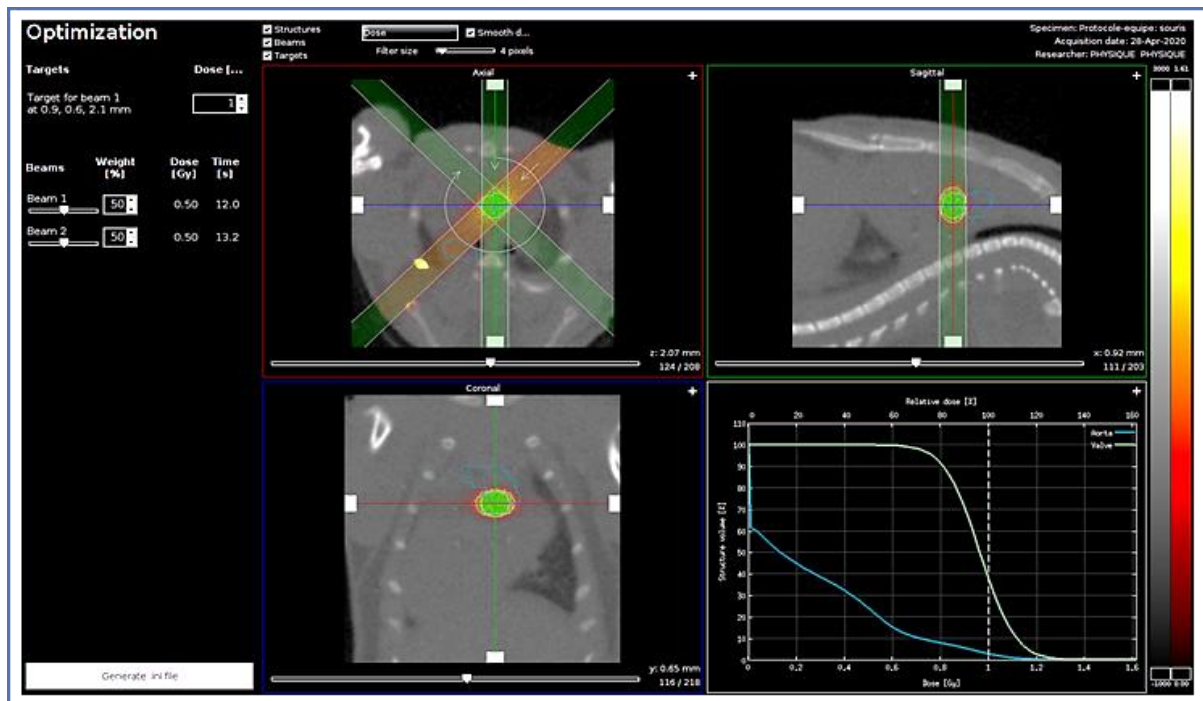


Figure III-5 B : Planification de l'irradiation.

En haut à gauche : coupe transversale. En bas à gauche : coupe coronale. En haut à droite : coupe sagittale. En bas à droite : répartition de la dose. Les bandes colorées sur les images indiquent la trajectoire des différents faisceaux.

C. IMAGERIE CARDIAQUE

1. Imagerie par ultrasons

a) Principe

L'imagerie par ultrasons ou échographie est une modalité de l'imagerie qui se base sur les ultrasons pour visualiser les organes et tissus. Une sonde émettrice réceptrice envoie des ultrasons dans l'organisme qui sont réfléchis en rencontrant les structures et tissus ou les globules rouges pour l'échographie Doppler. Cette dernière permet de mesurer les vitesses du sang et les gradients de pression. L'échocardiographie permet différents modes d'acquisition dont le mode M (Mouvement) ou TM (Temps Mouvement) et le mode Doppler. Le mode M permet l'acquisition des images dans différentes vues comme la vue parasternale grand axe et la vue parasternale petit axe pour visualiser les structures cardiaques. L'échocardiographie

permet ainsi d'évaluer les dimensions ventriculaires, atriales, de l'aorte et d'autres vaisseaux, de même que les fonctions diastoliques et systoliques. L'échocardiographie Doppler est la technique d'imagerie de référence pour l'évaluation non-invasive de la sténose aortique et de la sévérité de l'atteinte hémodynamique. L'échocardiographie possède une meilleure résolution temporelle que l'IRM et une meilleure évaluation des paramètres hémodynamiques.

Dans le cadre de ce travail, nous avons mesuré les vitesses transvalvulaires dont la vitesse maximale (V_{max}) qui est la vitesse maximale du flux sanguin à travers la valve aortique en systole. Nous avons également mesuré les gradients de pression transvalvulaires, maximal (ΔP_{max}) et moyen (ΔP_{moy}), qui sont la différence de pression de part et d'autre de la valve aortique (aorte et ventricule gauche). Le gradient de pression est calculé à partir des vitesses transvalvulaires avec l'équation de Bernoulli.

$$\Delta P = 4 \times V^2$$

b) Acquisition des images

Un suivi échographique a été réalisé sur les animaux au début de l'étude et 5 mois plus tard à la fin de l'étude. Les examens se sont déroulés sous anesthésie à l'isoflurane, avec une fréquence cardiaque inférieure à 450 bpm (battements par minute) en utilisant l'échographe Philips iE33 (Philips Healthcare, Best, Pays-Bas) et une sonde linéaire L15-7io (128 éléments, 7-15 MHz). La fonction de la valve aortique a été évaluée en utilisant le mode Doppler à ondes pulsées. Le mode M en vue parasternale grand axe a été utilisé pour mesurer les dimensions de l'aorte et de l'oreillette gauche et en vue parasternale petit axe pour les dimensions du ventricule gauche (Figure III-6).

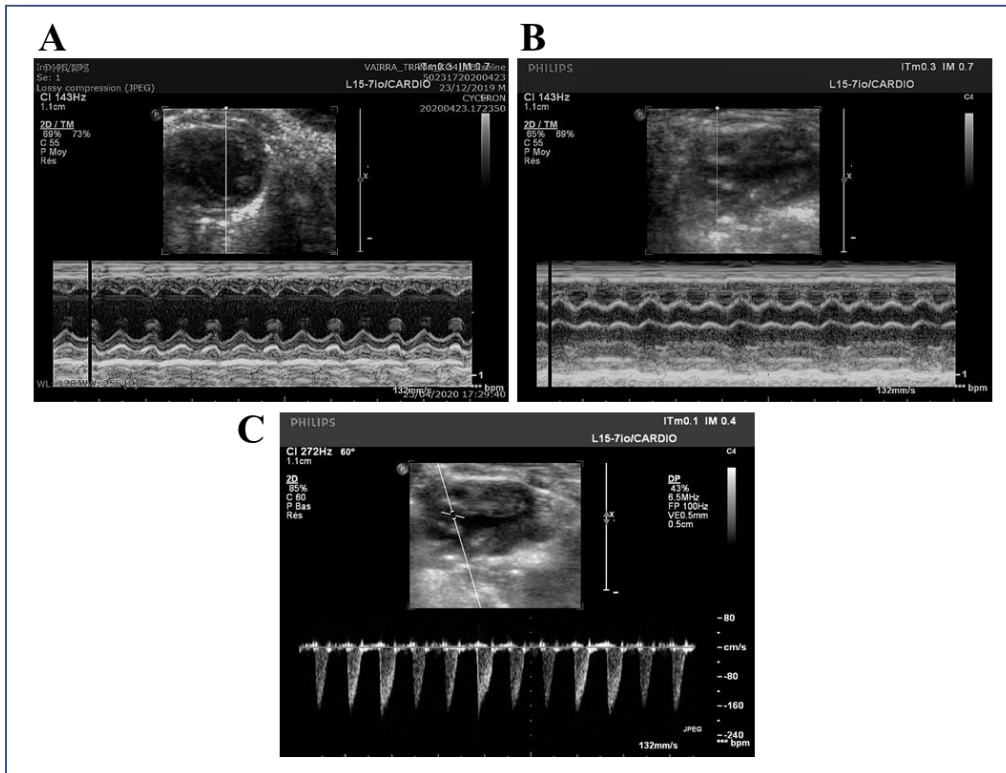


Figure III-6 : Images d'échocardiographie de cœur de souris

A : Mode M en petit axe : visualisation du ventricule gauche. **B** : Mode M en grand axe : visualisation du ventricule gauche, de l'aorte et de l'oreillette gauche. **C** : Mode Doppler en grand axe permettant la mesure du flux transvalvulaire.

2. Imagerie par résonance magnétique

a) Principe

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une modalité d'imagerie non invasive qui permet de visualiser différentes parties du corps. Elle a l'avantage de ne pas utiliser les rayonnements ionisants. Le principe de l'IRM est basé sur les propriétés magnétiques des atomes d'hydrogène (protons) contenus dans l'organisme. Grâce à un puissant aimant supraconducteur, les protons sont stimulés en modifiant le champ magnétique. Ils sont alors orientés dans la même direction puis les protons sont soumis temporairement à un deuxième champ magnétique oscillant (radiofréquence). Le retour à l'équilibre des protons, à l'arrêt de la stimulation, s'accompagne d'une émission d'un signal électromagnétique détectable et mesurable. Selon la composition du tissu, le signal recueilli n'est pas le même. L'IRM permet une évaluation complète de l'anatomie et de la fonction cardiaque ainsi que de la caractérisation du tissu myocardique.

Bien que l'échocardiographie transthoracique reste la principale technique d'imagerie pour évaluer la sténose aortique, l'IRM peut fournir des informations complémentaires (notamment en cas d'un diagnostic incomplet). Chez l'Homme, elle permet d'évaluer la structure et la fonction de la valve aortique, ainsi que la fonction et le volume du ventricule gauche, en plus de l'aorte. L'IRM permet de visualiser la valve aortique dans plusieurs plans mais aussi de visualiser l'orifice de la valve aortique. Ce qui permet de déterminer la morphologie de la valve (tricuspide ou bicuspid) et d'effectuer des mesures sur les caractéristiques morphologiques de la valve. Un avantage que l'échographie transthoracique ne permet pas.

L'avantage de l'IRM est qu'elle a une meilleure résolution spatiale que l'échographie et reste la référence pour mesurer les volumes et la fonction des ventricules gauche et droit, fournissant ainsi des informations essentielles sur le remodelage ventriculaire en réponse à la sténose aortique. Elle permet aussi de quantifier la vitesse maximale du flux à travers la valve aortique. Cependant, la résolution temporelle de l'IRM est moindre que celle de l'échocardiographie et les vitesses sont souvent sous-estimées. Contrairement à l'échocardiographie, certains patients présentent des contre-indications relatives à l'IRM comme certains implants (pacemaker, prothèse métallique) ; ce qui limite son utilisation chez l'Homme. Dans le cadre de cette étude sur les souris, nous avons utilisé l'IRM pour les mesures morphologiques ventriculaires.

b) Acquisition des images

L'acquisition des images d'IRM cardiaque a été réalisée sur tous les animaux en décubitus dorsal, sous anesthésie à l'isoflurane, comme pour l'irradiation à l'aide de l'IRM 7T petit animal (Pharmascan 70/16, Bruker, Ettlingen, Allemagne). L'acquisition s'est déroulée avec un suivi continu de la respiration et de l'électrocardiogramme pour synchroniser l'acquisition des images et la fréquence cardiaque. L'anesthésie a été adaptée afin de maintenir une fréquence respiratoire de 50-70 cycle par minute. La fonction des ventricules gauche et droit a été évaluée en utilisant la séquence multi coupe « IntraGate cine FLASH black-blood » en petit axe (champ de vision : 28×28 mm ; taille de la matrice : 128×128 ; résolution spatiale : $0,219 \times 0,219$ mm/pixel ; épaisseur de coupe : $560 \mu\text{m}$; 20 images/cycle cardiaque ; TR/TE : 73/2 ; angle de bascule : 25°). Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel Segment 3.2 (Segment Inc, San Francisco, CA, USA) (Figure III-7).

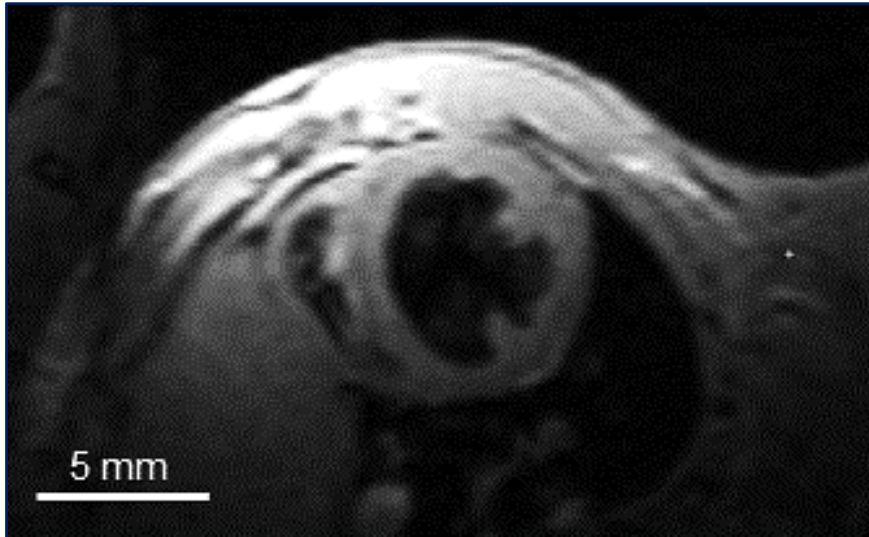


Figure III-7 : Image d'acquisition IRM de souris
Vue en petit axe d'un cœur de souris : visualisation des ventricules gauche et droit.

D. MARQUAGES ET ANALYSES HISTOLOGIQUES

1. Principe

Le marquage histochimique est une technique qui consiste à mettre en évidence les différents constituants d'un tissu (l'ADN, les protéines, les lipides, ...) mais aussi des agents pathogènes. Il est basé sur la réaction biochimique qui a lieu entre le colorant et le constituant d'intérêt.

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisées différentes colorations pour mettre en évidence les processus pathologiques de la sténose aortique. Nous avons utilisé les colorations suivantes :

- HES : hématoxyline (Labelians, Nemours, France), érythrosine (Labomoderne, Gennevilliers, France) et safran (RAL Diagnostics, Martillac, France) pour marquer les cellules et la matrice extracellulaire. Ce marquage colore le noyau en bleu, le cytoplasme en rose et le collagène en jaune (Figure III-8).
- Rouge Picro-Sirius (rouge Sirius, Labelians, Nemours, France ; acide picrique, VWR international, Rosny sous-bois, France). Il marque le collagène I et III en rouge (Figure III-8).

- Trichrome de Masson (hématoxyline, Labelians ; fushine acide, RAL Diagnostics ; ponceau xylidine, RAL Diagnostics ; acide phosphomolybdique, Honeywell Fluka, Illkirch, France ; vert lumière, RAL Diagnostics). Il a été utilisé pour visualiser les fibres de collagène. C'est un marquage successif de trois colorants : l'hématoxyline qui marque les noyaux en bleu foncé/noir, la fuchsine et le ponceau qui colorent le cytoplasme en rouge ainsi que le vert lumière qui marque les fibres de collagène en vert (Figure III-8).
- Rouge Alizarine (Sigma Aldrich, L'isle d'Abeau, France) a été utilisé pour visualiser les dépôts de calcium qui sont colorés en rouge (Figure III-8).
- Von Kossa qui marque les dépôts de calcium qui en noir (Figure III-8).

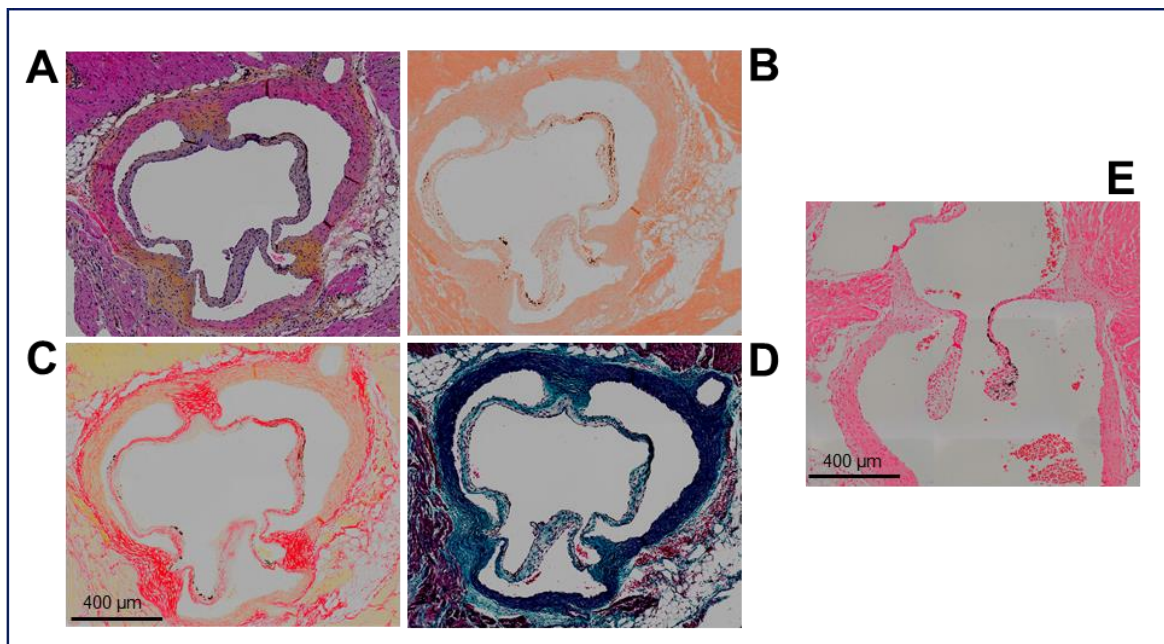


Figure III-8 : Coupe histologique d'une valve aortique de souris.

A, B, C, D : quatre Coupes transversales sériées. Coloration A : hématoxyline éosine safran, B : Rouge Alizarine, C : Rouge Pico-Sirius, D : Trichrome de Masson. E : coupe longitudinale, coloration au Von Kossa.

2. Prélèvement et Marquage

Cinq mois après l'irradiation, les souris ont reçu 100 µl d'héparine en injection intrapéritonéale cinq minutes avant la mise à mort par dislocation cervicale. Nous avons réalisé une sternotomie pour avoir accès au cœur puis une exsanguination par l'apex. Par la suite, nous avons injectés 300 µl de KCl (1M) dans le ventricule gauche, par l'apex, pour éliminer le reste du sang et produire une relaxation musculaire. Le cœur a été prélevé et fixé à la formaldéhyde 4% (VWR Chemicals, France) puis inclus dans la paraffine.

Les blocs de paraffine ont été coupés au microtome (RM2245, Leica, France) en plan longitudinal ou transversal. Pour chaque cœur en plan longitudinal, nous avons réalisé quatre coupes successives de 3 µm d'épaisseur au niveau de la valve aortique puis quatre autres coupes sériées 100 µm plus loin. Les coupes ont été placées sur des lames de microcopie en verre puis colorées. Pour les coupes les longitudinales, à l'HES avec l'automate Tissue TEK Prisma Plus (SAKURA Finetek, Villeneuve d'Ascq, France), le rouge Picro-Sirius, le rouge Alizarine et le Von Kossa. Deux coupes ont été traitées pour chaque coloration. En coupe longitudinale, les coupes ont été colorées à l'HES, le rouge Picro-Sirius, le trichrome de Masson et le rouge Alizarine.

3. Numérisation et quantification

Les lames obtenues ont été numérisées avec le microscope Olympus VS120 (Rungis, France) en lumière blanche et les images ont été analysées avec le logiciel QuPath 0.3.2 [311]. Les surfaces de la cuspide et de l'anneau de la valve ont été mesurées manuellement avec le logiciel Image J (US NIH, Bethesda, MD, USA). Pour chaque animal, la surface d'une cuspide a été déterminée comme la moyenne de deux cuspides afin de minimiser le biais dû à la localisation de la coupe. De même, la quantification de la coloration au rouge Picro-Sirius et au trichrome de Masson a été faite à l'aide du logiciel Image J.

E. PATCH-CLAMP

1. Principe

Le patch-clamp est une technique d'électrophysiologie qui permet de mesurer l'activité électrique d'un canal ionique à la membrane plasmique d'une cellule. Il mesure le courant ionique généré par le passage d'ions à travers les canaux. Cette technique a été développée par Neher et Sackman en 1976 ; ce qui leur a valu le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1991.

Le patch-clamp peut être réalisé dans différentes configurations selon les besoins de l'étude. Il permet d'étudier soit l'activité d'un canal ionique unitaire par les configurations cellule attachée (*cell-attached*) et patch excisé (*inside-out*), soit l'activité de l'ensemble des canaux ioniques présents à la membrane plasmique en configuration cellule entière (*Whole-Cell*) (Figure III-9).

L'expérimentation de patch-clamp consiste à sélectionner une cellule isolée puis rapprocher une micropipette de verre de la cellule. Une fois que la pipette touche la cellule (jonction cellule-pipette), la résistance de la micropipette augmente. La portion de la membrane en contact avec la micropipette est aspirée à l'aide d'une seringue pour générer un scellement. C'est l'interaction électrostatique entre la bicouche lipidique membranaire et le verre de la micropipette. Par la suite, le maintien de l'aspiration permet d'augmenter la résistance de la micropipette jusqu'à environ 1 GΩ. C'est l'obtention du « *gigaseal* », une jonction étanche entre la micropipette et la membrane plasmique. Ce qui correspond à la configuration cellule attachée. Pour obtenir la configuration *inside-out* que nous avons utilisé, la micropipette est remontée délicatement pour exciser une portion de la membrane. La solution contenue dans la micropipette devient le « milieu extracellulaire » et le bain correspond au milieu intracellulaire. La face interne du canal se retrouve exposé dans le bain, d'où le nom *inside-out* (Figure III-9). Dans cette configuration nous pouvons contrôler la composition du milieu intracellulaire et extracellulaire.

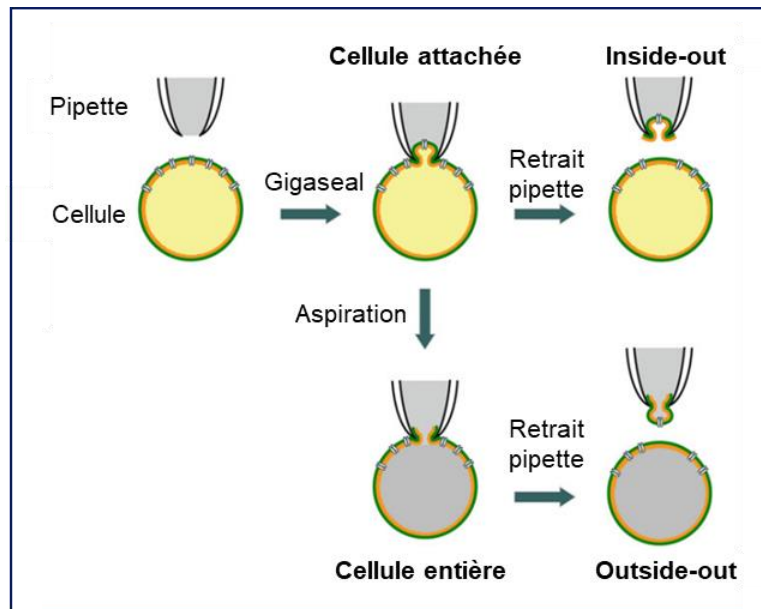


Figure III-9 : Les différentes configurations d'enregistrement en patch-clamp.

Figure modifiée d'après Chen *et al.* [312]

2. Equipements de patch-clamp

Un poste de patch-clamp comprend différents appareils. Un microscope inversé couplé à une caméra Nikon Eclipse Ti (Nikon, France) qui permet de visualiser les cellules et de finement approcher la micropipette de la cellule à l'aide du micromanipulateur MP285 (Sutter Instrument, USA). L'électrode de mesure, en filament d'agent chloruré, est relié à un convertisseur qui à son tour est relié à l'amplificateur Axopatch 200B (Axon Instrument, USA). Un ordinateur qui contient une carte d'acquisition DigiData 1322 (Axon Instrument, USA) convertit le signal analogique enregistré en signal numérique. Il permet aussi de paramétrer les expérimentations de patch grâce au logiciel pClamp 9.0. L'analyse des données se fait avec le logiciel Clampfit (un module de pClamp). Le poste comprend aussi une table anti-vibrations où sont placés le microscope et le micromanipulateur ; le tout dans une cage de Faraday.

Les micropipettes utilisées dans les expérimentations sont réalisées à partir de capillaires en verre de 1,17 mm de diamètre interne (phymep, France). Le capillaire est étiré en utilisant une étireuse horizontale multistep Sutter P97 (Sutter Instrument, USA). Puis à l'aide d'une microforge MF 830 (Narishige, Japon), la micropipette est polie et affinée pour réduire son diamètre afin d'obtenir une résistance entre 6 et 8 M Ω .

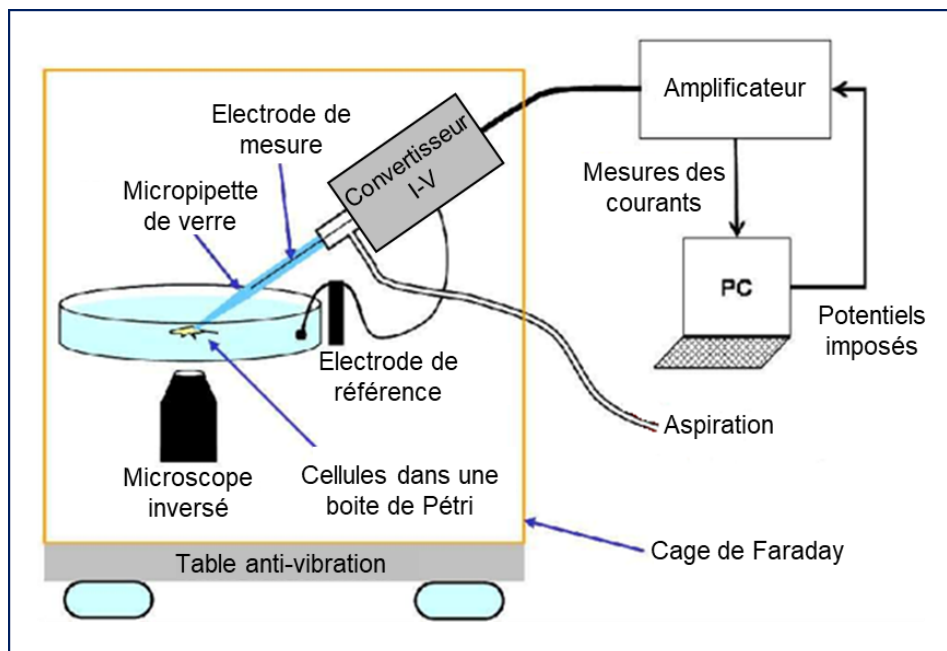


Figure III-10 : Schéma représentatif d'un poste de patch-clamp
D'après Sordel [313]

3. Protocole d'enregistrement

Nous avons utilisé la configuration *inside-out* pour caractériser le canal TRPM4 sur les cellules interstitielles de la valve en mode voltage imposé. Pour ce faire, nous avons utilisé les solutions ci-dessous (tableau 6).

Solutions	Pipette	Bain	Perfusion		
[mM]			145 NaCl	42 NaCl	145 NaCl
NaCl	145	140	145	42	
KCl	1,2	4,8	1,2		145
MgCl ₂	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Glucose	10	10	10	10	10
HEPES	10	10	10	10	10
Sucrose	0	0	0	206	0
Ca ²⁺	1,8	1	10 ⁻⁹ , 10 ⁻⁶ et 10 ⁻³ M	1	1
pH	7,4	7,4	7,2	7,2	7,2

Tableau 6 : Solutions utilisées en patch-clamp

Le protocole de la caractérisation du canal TRPM4 consiste à appliquer différents voltages entre -100mV et +100mV sur une portion membrane. Pour chaque potentiel imposé, une amplitude de courant est obtenue et permet de tracer la courbe courant/tension (I/V) dont la pente est la conductance du canal. La description de l'analyse des résultats de patch-clamp sera détaillée dans la partie résultats complémentaires.

F. ANALYSES STATISTIQUES

L'ensemble des résultats obtenus ont été analysés avec le logiciel Addinsoft XLstat 2021 (New York, NY, USA). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M (erreur standard). Les différents groupes ont été comparés en utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi d'un test post-hoc de Dunn. Un test apparié a été utilisé pour comparer les paramètres entre les mêmes animaux au début du protocole et après 5 mois. De plus, nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann-Whitney pour comparer deux groupes lorsque c'était nécessaire. La différence entre les groupes est considérée comme statistiquement significative pour des valeurs de $p \leq 0,05$. Les différences statistiquement significatives sont indiquées dans les graphiques par des astérisques. N désigne le nombre de souris utilisées.

RESULTATS

IV. RESULTATS

A. TRPM4 PARTICIPE AU REMODELAGE RADIO-INDUIT DE LA VALVE AORTIQUE CHEZ LA SOURIS

1. Introduction

La sténose aortique est une pathologie caractérisée par un rétrécissement de l'ouverture de la valve aortique. Plusieurs études montrent que les patients ayant subi une radiothérapie thoracique peuvent développer des complications cardiaques telles que péricardite, cardiomyopathie, coronaropathie et une valvulopathie. De plus, des études ont montré que des patients traités par radiothérapie pour les cancers comme le lymphome de Hodgkin et le cancer du sein développent des dysfonctionnements valvulaires tel qu'une sténose.

Différents acteurs moléculaires et cellulaires participent à la physiopathologie de la SA dont les cellules interstitielles valvulaires qui jouent un rôle clé dans ce processus. En condition pathologique, les VICs sont activées et acquièrent un phénotype myofibroblastique responsable du remodelage de la matrice extracellulaire. Par la suite elles évoluent vers un phénotype ostéoblastique qui participe à la minéralisation de la valve.

Le canal TRPM4 appartient à la famille des canaux TRP. Il est activé par le calcium et est perméable au sodium et au potassium. Une étude récente du laboratoire a démontré que le canal TRPM4 participe à la transition des fibroblastes atriaux humains en myofibroblastes : un phénomène présentant des similitudes avec ceux observés au cours de la sténose aortique. En outre, l'expression protéique du canal est augmentée dans les valves humaines calcifiées.

L'objectif de ce travail a été de déterminer la part du canal TRPM4 dans le processus physiopathologique de la SA radio-induite. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un modèle de souris *Trpm4^{+/+}* et *Trpm4^{-/-}* de 4 mois soumises ou non à une irradiation de 10 Gy au niveau de la valve aortique. Les paramètres cardiaques ont été évalués par échographie et IRM avant et 5 mois après irradiation. À la fin du protocole, les animaux ont été mis à mort et les cœurs ont été prélevés pour des analyses morphologiques et histologiques.

2. Résultats

Cinq mois après l'irradiation, les souris *Trpm4^{+/+}* présentaient une vitesse maximale (V_{max}) et un gradient de pression moyen (ΔP_{moy}) significativement plus importants comparé aux souris *Trpm4^{+/+}* non irradiées alors qu'aucune différence n'a été observée chez les animaux *Trpm4^{-/-}*. De plus, les souris *Trpm4^{+/+}* irradiées avaient un épaississement ainsi qu'une fibrose des feuillets plus importante par rapport aux souris contrôles. Cependant, aucune différence n'a été observé dans le groupe des souris *Trpm4^{-/-}*. Nous avons également observé une corrélation significative entre les paramètres morphologiques et fonctionnels de la valve aortique.

3. Conclusion

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure qu'après l'irradiation de la valve aortique, les souris *Trpm4^{+/+}* présentent une augmentation de V_{max} , signe d'une sténose de la valve, une surface du feuillet plus importante traduisant un épaississement des feuillets valvulaire et une fibrose plus importante. Ces éléments sont des caractéristiques pathologiques importantes de la SA.

Nos résultats ont permis de montrer que le canal TRPM4 participe au remodelage valvulaire radio-induit. Mettant ainsi en lumière ce canal comme une cible potentielle dans les stratégies de prévention contre ces dommages. Plus largement, ils permettent aussi de faire un lien entre l'expression du canal TRPM4 et la SA.

Ces résultats ont été publiés dans la revue *Cancers*. Ils sont présentés sous la forme de l'article publié ci-après :

Mpweme Bangando H, Simard C, Aize M, Lebrun A, Manrique A, Guinamard R. TRPM4 participates in irradiation-induced aortic valve remodeling in mice. *Cancers* 2022, 14:4477.

Article

TRPM4 Participates in Irradiation-Induced Aortic Valve Remodeling in Mice

Harlyne Mpweme Bangando, Christophe Simard, Margaux Aize, Alexandre Lebrun, Alain Manrique, Romain Guinamard * and on behalf of the STOP-AS Investigators

Normandie Université, UR 4650, Physiopathologie et Stratégies d'Imagerie du Remodelage Cardiovasculaire, GIP Cyceron, CHU de Caen, UNICAEN, Campus Jules Horowitz, BP 5229, 14074 Caen, France

* Correspondence: romain.guinamard@unicaen.fr

Simple Summary: Despite its benefit in cancer treatment, thoracic irradiation can induce aortic valve stenosis with fibrosis and calcification. The TRPM4 cation channel is known to participate in cellular remodeling including the transition of cardiac fibroblasts to myofibroblasts, similar to that observed during aortic valve stenosis. This study evaluates if TRPM4 is involved in irradiation-induced aortic valve damage. The aortic valve of mice was targeted by irradiation. Cardiac echography 5 months after treatment revealed an increase in aortic jet velocity, indicating stenosis. This was not observed in non-treated animals. Histological analysis revealed an increase in valvular cusp surface associated with fibrosis which was not observed in non-treated animals. The experiments were reproduced on mice after *Trpm4* gene disruption. In these animals, irradiation did not induce valvular remodeling. It indicates that TRPM4 influences irradiation-induced aortic valve damage and thus could be a target to prevent such side effects of irradiation.



Citation: Mpweme Bangando, H.; Simard, C.; Aize, M.; Lebrun, A.; Manrique, A.; Guinamard, R.; on behalf of the STOP-AS Investigators. TRPM4 Participates in Irradiation-Induced Aortic Valve Remodeling in Mice. *Cancers* **2022**, *14*, 4477. <https://doi.org/10.3390/cancers14184477>

Academic Editor: Nobuyuki Hamada

Received: 21 July 2022

Accepted: 9 September 2022

Published: 15 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Thoracic radiotherapy can lead to cardiac remodeling including valvular stenosis due to fibrosis and calcification. The monovalent non-selective cation channel TRPM4 is known to be involved in calcium handling and to participate in fibroblast transition to myofibroblasts, a phenomenon observed during aortic valve stenosis. The goal of this study was to evaluate if TRPM4 is involved in irradiation-induced aortic valve damage. Four-month-old *Trpm4*^{+/+} and *Trpm4*^{-/-} mice received 10 Gy irradiation at the aortic valve. Cardiac parameters were evaluated by echography until 5 months post-irradiation, then hearts were collected for morphological and histological assessments. At the onset of the protocol, *Trpm4*^{+/+} and *Trpm4*^{-/-} mice exhibited similar maximal aortic valve jet velocity and mean pressure gradient. Five months after irradiation, *Trpm4*^{+/+} mice exhibited a significant increase in those parameters, compared to the untreated animals while no variation was detected in *Trpm4*^{-/-} mice. Morphological analysis revealed that irradiated *Trpm4*^{+/+} mice exhibited a 53% significant increase in the aortic valve cusp surface while no significant variation was observed in *Trpm4*^{-/-} animals. Collagen staining revealed aortic valve fibrosis in irradiated *Trpm4*^{+/+} mice but not in irradiated *Trpm4*^{-/-} animals. It indicates that TRPM4 influences irradiation-induced valvular remodeling.

Keywords: TRPM4; aortic valve; stenosis; fibrosis

1. Introduction

While cancer therapies significantly improve patient survival, the appearance of late side effects may impair long-term quality of life in cancer survivors. Among these, irradiation therapies are known to favor long-term heart diseases, mostly in patients with Hodgkin disease, and breast or lung cancers. Indeed, the heart can be exposed to ionizing radiation when located, even partially, in the irradiation field [1]. Among the wide spectrum of radiotherapy-induced heart disease, cardiac valve remodeling may affect 2–37% of patients treated with radiotherapy for Hodgkin's lymphoma and 0.5–4.2%

of patients treated for breast cancer [2]. The incidence of valve lesions is related to the radiation dose [3], and especially involves the aortic valve due to its anatomical location relatively close to the mediastinum [4].

Radiation-induced valvular remodeling includes thickening of the valvular cusps which might be accompanied by fibrosis and calcification leading to stenosis [2]. Interestingly, the incidence of valvular disease correlates much more with radiation dose delivered directly to the valve than to the mediastinal dose, which indicates that valvular remodeling is mostly due to a direct effect on valvular cells [5]. At the cell level, mechanisms linking radiotherapy to valvular remodeling remain to be determined. The primary cause of radiation-induced damage in cardiac tissue arises from endothelial cell injury which occurs minutes after radio treatment [1]. It induces release of inflammatory molecules responsible for the acute phase inflammatory response during a few days after irradiation. Later on, it leads to the activation of fibrogenic effector cells which can differentiate into myofibroblasts secreting collagen and α -smooth muscle actin [6]. The permanent activation of myofibroblasts leads to fibrosis which develops in the long term and ultimately results in cardiac dysfunction. While cardiac tissue is composed of cardiomyocytes, fibroblasts, and endothelial cells, the valvular tissue is mainly composed of valvular endothelial cells and valvular interstitial cells, the latter being fibroblasts. All these cell types were shown to be sensitive to irradiation and thus may participate in valvular damage after radiotherapy. Note that the fibroblast-to-myofibroblast transition is known to occur in aortic stenosis when quiescent valvular interstitial cells differentiate into myofibroblasts with the synthesis of collagen and α -smooth muscle actin. According to this, the actors involved in fibroblast transition might be involved in irradiation-induced valvular damage.

In a recent study, we observed that the differentiation to myofibroblasts of human atrial fibroblasts in culture was dependent on the Transient Receptor Potential Melastatin 4 (TRPM4) ion channel protein [7]. Pharmacological inhibition of TRPM4 reduced the development of these fibroblasts in culture. In addition, the expression of α -smooth muscle actin, a marker of myofibroblast differentiation, during culture of mouse atrial fibroblasts was reduced when the *Trpm4* gene was disrupted [7]. TRPM4 belongs to the family of TRP channels, highly expressed in cardiac tissues and participating in cardiac development and functions [8]. It is a non-selective monovalent cation channel (Na^+ and K^+ permeable) widely expressed in tissues with a large panel of physiological as well as pathological implications with an influence on Ca^{2+} -homeostasis [9–12]. The implication of TRPM4 in cardiac activity was extensively investigated for its contribution to electrical activities and their disturbances [13]. Moreover, the channel was also shown to be involved in cardiac morphological remodeling in mice with an influence on ventricular hypertrophy [14,15] as well as ventricular fibrosis induced by pressure overload in mice [16]. Finally, TRPM4 was recently shown to be overexpressed at the protein level in aortic valves from patients suffering from aortic stenosis [17].

We thus hypothesized that TRPM4 might participate in aortic valve remodeling after radiotherapy according to its contribution to fibroblast differentiation. The goal of this study was to evaluate if the channel might be involved in irradiation-induced valvular remodeling. Using a model of targeted aortic valve irradiation in mice, we observed the development of aortic valve stenosis associated with fibrosis 5 months after irradiation treatments which was prevented in transgenic mice lacking TRPM4 expression.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval

Experiments were carried out in strict accordance with the European Commission Directive 2010/63/EU for animal care. They were conducted with authorization for animal experimentation by the French “ministère de l’enseignement supérieur de la recherche et de l’innovation” referral APAFIS#23869-2020012911013146 v6.

2.2. Animal Model and Irradiation

Knockout mice ($Trpm4^{-/-}$) and littermate controls ($Trpm4^{+/+}$) were obtained from a C57BL/6J strain as described previously [18]. Four-month-old males from both genotypes were used and raised for 5 additional months. The genotype for each animal was confirmed by genomic PCR performed on tail DNA with primers specific to wild-type and null alleles according to previously reported proceedings [18].

Animals were housed in cages to European standards (type IV), with pathogenic-free and controlled environments (21 ± 1 °C; humidity 60%; pressure 20–25 Pa; lights on 6:45 AM to 6:45 PM; enriched environment). Food and water were available ad libitum. Animals were housed at a maximum of 5 mice per cage. All efforts were made to minimize animal suffering and number.

A total of 70 animals were randomly allocated to the irradiation protocol or not. In the $Trpm4^{+/+}$ group, 20 mice were subjected to irradiation while 20 others were used as the control. In the $Trpm4^{-/-}$ group, 15 mice were subjected to irradiation while 15 others were used as the control. Irradiation was completed using the X-RAD225 Cx system (Precision X-ray Inc., North Brandford, CT, USA; CYCERON biomedical imaging platform, Caen, France). Prior to irradiation, mice anesthesia was induced by a 30 s shot of 5% isoflurane (Forene®, AbbeVie, Rungis, France) and afterwards anesthesia was maintained with 2% isoflurane in a mix of 30% O₂, 70% N₂O until the end of the irradiation protocol. The animals were placed in a supine position and the aortic valve was spotted using computed tomography to allow alignment to a homemade mouse cardiac atlas previously acquired. Planning of the irradiation exposure was performed using SmartPlan® (Precision X-ray Inc., North Brandford, CT, USA). The irradiation consisted of 2 beams of 5 Gy each, 2 mm diameter, with angles of 45° and 315° respectively (120–130 s duration).

2.3. Echocardiography

Echocardiography was performed using an iE33 ultrasound system connected with a linear high-frequency L15-7io ultrasound transducer (Philips Healthcare, Best, the Netherlands). Measurements were performed on anesthetized animals (isoflurane 1.5% in 30% O₂, 70% N₂O) before irradiation and 5 months after irradiation. Animals were placed in a supine position, shaved on the chest using a chemical hair remover, and ultrasound gel was applied to optimize the detection of cardiac chambers. Atrial and aortic root diameters were measured using the TM-mode. Doppler measurements were used to evaluate aortic valve function according to the peak aortic jet velocity and mean transaortic pressure gradient (ΔP_{mean}). The Doppler recordings were obtained at the level of the aortic root, the aortic valve clicks being used as reference points for Doppler measurements. All values were calculated as the mean of three consecutive measurements. The heart rate was obtained from M-mode recordings.

2.4. Magnetic Resonance Imaging

Cardiac magnetic resonance (CMR) imaging was performed in all animals, under isoflurane anesthesia (similar to the irradiation protocol), using a dedicated 7T magnet (Pharmascan 70/16, Bruker, Ettlingen, Germany). The animals were imaged in the supine position, with continuous dual respiratory and ECG monitoring. Anesthesia was adapted in order to maintain a respiratory frequency of 50–70 per minute [19]. Left and right ventricular function was assessed using a multi-slice dark blood intragate cine flash sequence acquired in small axis (field of view: 28×28 mm; matrix size: 128×128 ; spatial resolution: 0.219×0.219 mm/pixel; slice thickness: 560 µm; 20 frames/cardiac cycle; TR/TE: 73/2; flip angle: 25°). Image processing was performed using the Segment 3.2 software version 3.2, Segment Inc., San Francisco, CA, USA, (<http://segment.heiberg.se>).

2.5. Histological Analysis and Staining

At 5 months post-irradiation, animals were killed by cervical dislocation. The chest was open and the heart injected in the left ventricle (from the apex) with KCl 1 mol L⁻¹ in the aim to remove the blood and produce muscular relaxation. The heart was then removed, immersed in formalin, and fixed in paraffin. A series of hearts were used for longitudinal slices while another was used for transversal slices performed using a microtome. For each heart, four successive 3 µm-thick slices were collected in the area of the aortic valve, and then 100 µm further, a second series of 4 slices was completed. Slices were placed on glass microscope slides for staining. For each heart, two slices were stained with classical Hematoxylin (Labelians, Nemours, France), Erythrosine (Labomoderne, Gennevilliers, France), Saffron (RAL Diagnostics, Martillac, France) (HES) using the apparatus Tissue TEK Prisma Plus (SAKURA Finetek, Villeneuve d'Ascq, France) to reveal cell nuclei (blue) as well as cytoplasm (pink) and collagen fibers (yellow). Two slices were stained with alizarin red (Sigma Aldrich, L'isle d'Abeau, France) and two others with Von Kossa to detect calcium deposits. Two slices were stained with Picrosirius Red to reveal collagen (Sirius Red, Labelians, Nemours, France; Picric acid, VWR international, Rosny sous Bois, France). In the series with transversal slices in addition to the staining indicated above, two slices for each heart were labeled using Masson trichrome to reveal extracellular matrix (hematoxylin, Labelians; fuschin acid, RAL Diagnostics; ponceau xyloidin dye, RAL Diagnostics; phosphomolybdic acid, Honeywell Fluka, Illkirch, France; light green, RAL Diagnostics).

After staining, slices were digitized in white light using an Olympus VS120 microscope (Rungis, France) then analyzed using the QuPath software version 0.3.2, University of Edinburgh, Edinburgh, UK [20]. Cusp surface and sinus parameters were evaluated with manual measurements using Image J software (US NIH, Bethesda, MD, USA). For each animal, the surface of a cusp was determined as the mean of two cusps to minimize variations due to slicing level.

For Sirius red staining intensity quantification, the images were displayed in the red chromaticity mode using Qu Path, then intensity was quantified using Image J. For the longitudinal slices, for each valve, the intensity was determined as the mean of intensity of 3 rectangles of 200 × 50 µm in different areas of the cusps. Then, the mean intensity of 2 areas (200 × 50 µm) of the image outside of the tissue was subtracted to eliminate background signal. For the transversal slices, the same proceeding was applied with rectangles of 100 × 50 µm. For Masson trichrome staining quantification, the same proceeding was applied while the images were displayed in the green chromaticity mode using Qu Path and measured rectangles were 100 × 50 µm. Finally for Sirius red as well as Masson trichrome staining intensity quantification in the atrium and ventricle, the same proceeding was applied with squares of 100 × 100 µm.

2.6. Data Analysis

Results are reported as mean ± S.E.M. Data were analyzed using Addinsoft Xlstat 2021 (New York, NY, USA). To compare data between groups, a non-parametric Kruskal–Wallis test was used, followed by a post-hoc Dunn's test. When appropriate, i.e., for comparison of parameters between M0 and M5 in the same animal, a paired test was used. Statistically significant difference was achieved for values of $p \leq 0.05$. Statistically significant differences are indicated in the graphs by asterisks. N refers to the number of mice used.

3. Results

Four-month-old mice from *Trpm4*^{+/+} as well as *Trpm4*^{-/-} genotypes were randomly attributed to two groups, one being treated by aortic valve irradiation while the other was not. At the onset of the protocol (baseline), animals' weights were similar between all groups (Table 1). Cardiac parameters were evaluated by echocardiography and CMR imaging measurements before the irradiation protocol and 5 months after irradiation (M5). At M5, hearts were removed for histological analysis. In the following paragraphs and figures, mice treated by irradiation were designated RT+ while mice not treated by irradiation were designated RT-.

Table 1. Echocardiographic findings. Transthoracic echocardiography parameters in 4-month-old mice at baseline (before irradiation) and 5 months after irradiation (M5). Animals were randomly allocated to radiation treatment (RT+) or not (RT-). Data are mean \pm S.E.M. * statistically different from +/+ RT-. LA: left atrium; A: aorta; V_{max}: maximal velocity; ΔP_{mean} : mean transaortic pressure gradient.

	<i>Trpm4</i> ^{+/+} RT-	<i>Trpm4</i> ^{+/+} RT+	<i>Trpm4</i> ^{-/-} RT-	<i>Trpm4</i> ^{-/-} RT+
Baseline	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 15	<i>n</i> = 15
Body weight (g)	28.9 \pm 0.5	29.0 \pm 0.4	28.9 \pm 0.7	28.1 \pm 0.7
Heart rate (bpm)	414 \pm 12	428 \pm 9	400 \pm 16	426 \pm 16
LA diameter (mm)	1.74 \pm 0.07	1.73 \pm 0.05	1.78 \pm 0.05	1.65 \pm 0.07
A root diameter (mm)	1.78 \pm 0.03	1.79 \pm 0.03	1.73 \pm 0.05	1.71 \pm 0.05
Aortic valve jet V _{max} (cm.s ⁻¹)	157.1 \pm 7.4	155.7 \pm 6.0	158.8 \pm 7.4	144.7 \pm 4.7
ΔP_{mean} (mmHg)	4.6 \pm 0.4	4.6 \pm 0.3	5.1 \pm 0.5	3.8 \pm 0.3
M5	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 14	<i>n</i> = 15
Body weight (g)	33.7 \pm 0.6	33.7 \pm 0.7	34.2 \pm 2.6	33.9 \pm 1.1
Heart rate (bpm)	455 \pm 12	447 \pm 14	430 \pm 16	418 \pm 16
LA diameter (mm)	1.80 \pm 0.05	1.88 \pm 0.05	1.80 \pm 0.05	1.81 \pm 0.04
A root diameter (mm)	1.78 \pm 0.04	1.78 \pm 0.04	1.89 \pm 0.05	1.78 \pm 0.04
Aortic valve jet V _{max} (cm.s ⁻¹)	185.2 \pm 7.9	240.9 \pm 17.2 *	212.3 \pm 11.7	210.9 \pm 8.3
ΔP_{mean} (mmHg)	6.5 \pm 0.7	11.7 \pm 2.1 *	8.3 \pm 1.4	8.4 \pm 0.6

3.1. Irradiation-Induced Functional Remodeling

Echocardiography at baseline then M5 revealed a significant time-dependent increase in maximal aortic valve jet velocity as well as mean transaortic pressure gradient (ΔP_{mean}) in all groups indicating an effect of aging. However, irradiation significantly enhanced this increase in *Trpm4*^{+/+} but not in *Trpm4*^{-/-} animals (Figure 1). At M5, maximal aortic valve jet velocity from RT+ *Trpm4*^{+/+} was significantly higher than from RT- *Trpm4*^{+/+} (240.9 \pm 17.2 and 185.1 \pm 7.9 cm.s⁻¹, respectively) while no difference was observed in *Trpm4*^{-/-} depending on irradiation treatment (210.9 \pm 8.3 cm.s⁻¹ for RT+ and 212.3 \pm 11.7 cm.s⁻¹ for RT-) (Figure 2). Similar variations were observed for ΔP_{mean} at M5 with a significantly higher value for RT+ compared to RT- *Trpm4*^{+/+} mice (11.7 \pm 2.1 and 6.5 \pm 0.7 mmHg, respectively) but no significant difference between RT+ and RT- *Trpm4*^{-/-} animals (8.4 \pm 0.6 mmHg and 8.3 \pm 1.4 mmHg, respectively) (Figure 2 and Table 1). No aortic valve regurgitation was detected in any group (Figure 2).

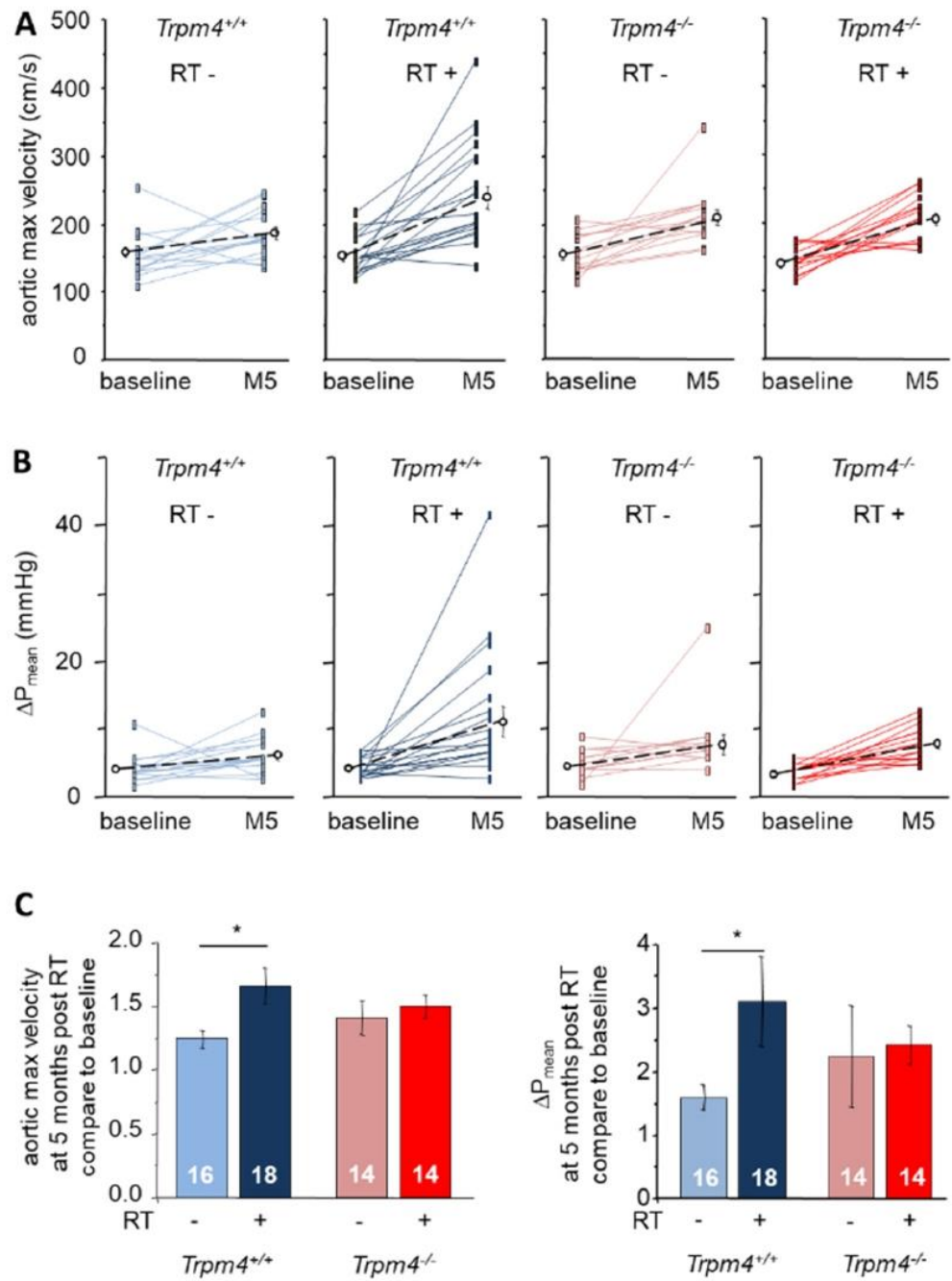


Figure 1. Evolution of the maximal aortic valve jet velocity and mean pressure gradient after radiation treatment. (A) Maximal aortic valve jet velocity measured at baseline and 5 months after irradiation treatment (RT+) or not (RT−) in *Trpm4^{+/+}* and *Trpm4^{-/-}* mice. Plain lines indicate paired data for the same mouse at baseline and 5 months. Dotted lines and open circles indicate the mean ± S.E.M for each group. (B) Mean pressure gradient (ΔP_{mean}) measured at baseline and 5 months as explained in A. (C) For each mouse, maximal aortic valve jet velocity (left) as well as ΔP_{mean} (right) measured at 5 months post-treatment was reported compared to that of baseline (4-month-old mice). Histograms indicate the mean ± S.E.M. for each group. In all figures, numbers in bars indicate the number of animals and * indicates a significant difference between groups ($p < 0.05$).

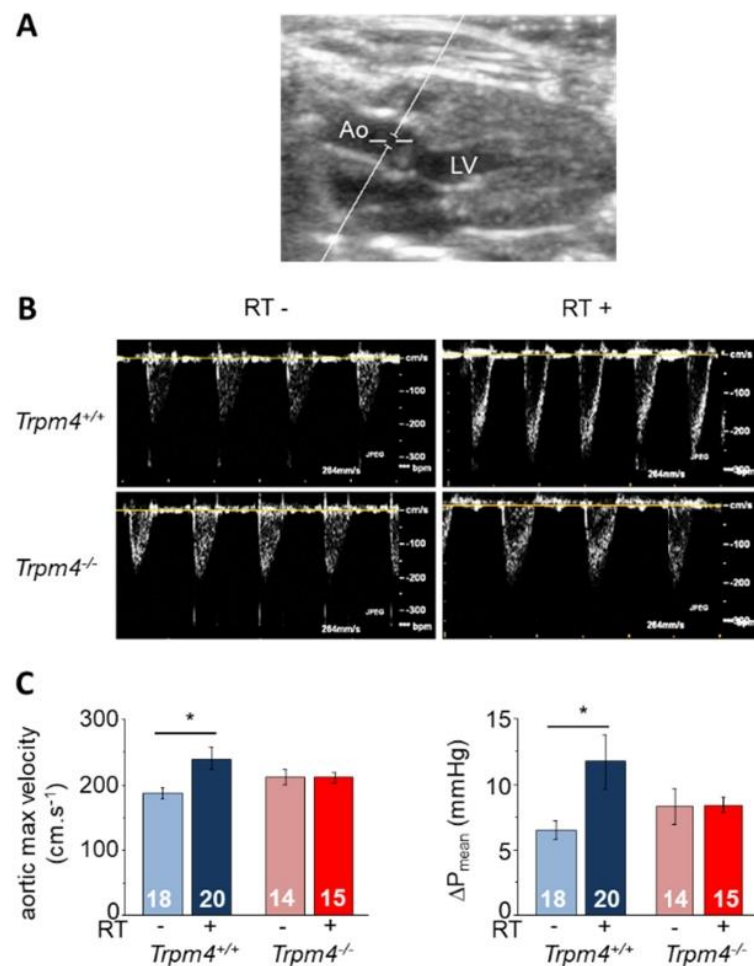


Figure 2. Functional valvular remodeling 5 months after radiation treatment. (A,B) Examples of transthoracic echocardiography in the Doppler mode for *Trpm4*^{+/+} and *Trpm4*^{-/-} without (RT−) or with (RT+) irradiation at 5 months post-treatment on anesthetized 9-month-old male mice. Measurements were made at the aortic valve level to reveal aortic flux velocity. The image provided in A allows to visualize where the measurements were taken. LV (left ventricle); Ao (aorta). (C) Mean maximal aortic valve jet velocity (left) and mean pressure gradient (ΔP_{mean}) (right) for each group according to the echocardiography. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * indicates a significant difference between groups ($p < 0.05$).

3.2. Irradiation-Induced Morphological Remodeling

CMR imaging and echography measurements at M5 did not reveal any effect of irradiation on ventricular parameters as well as left atrial diameter and aortic root diameter, whatever the genotype (Tables 1 and 2). Animal weights were also similar between all groups but significantly higher than that of baseline (Table 1). Note that left ventricular hypertrophy appeared in *Trpm4*^{-/-} mice compared to *Trpm4*^{+/+} animals, as already reported in this mouse strain [14,15,21], but was not affected by irradiation.

Aortic valve morphological parameters were determined using surface measurements on histological slices from hearts collected at M5. Regarding longitudinal slices, the surface of a cusp was similar in *Trpm4*^{+/+} and *Trpm4*^{-/-} animals (Figure 3) when non-irradiated. Irradiation induced a significant increase in cusp surface in *Trpm4*^{+/+} mice but not in *Trpm4*^{-/-} animals (Figure 3). The same results were observed when the total surface of the cusp and annulus (insertion of the cusp) was taken into account.

Table 2. Cardiac magnetic resonance imaging findings. CMR imaging parameters in 4-month-old mice at baseline (before irradiation) and 5 months after irradiation treatment (M5). Animals were randomly allocated to radiation treatment (RT+) or not (RT−). Data are mean ± S.E.M. * statistically different from +/+ . † statistically different from +/+ RT−. ‡ statistically different from +/+ RT+. LV: left ventricle; LVEDV: left ventricular end diastolic volume; LVESV: left ventricular end systolic volume; LVEF: left ventricular ejection fraction; RVEDV: right ventricular end diastolic volume; RVESV: right ventricular end systolic volume; RVEF: right ventricular ejection fraction.

	Trpm4 ^{+/+} RT−	Trpm4 ^{+/+} RT+	Trpm4 ^{-/-} RT−	Trpm4 ^{-/-} RT+
Baseline	n = 17	n = 20	n = 14	n = 15
LV mass/body mass (mg.g ⁻¹)	2.59 ± 0.11	2.79 ± 0.10	2.92 ± 0.12 *	2.95 ± 0.12 *
LVEDV/body mass (μL.g ⁻¹)	2.18 ± 0.12	2.25 ± 0.20	1.91 ± 0.16	1.99 ± 0.15
LVESV/body mass (μL.g ⁻¹)	0.81 ± 0.06	0.97 ± 0.11	0.71 ± 0.08	0.77 ± 0.08
LVEF (%)	63 ± 2	59 ± 3	64 ± 2	62 ± 3
RVEDV/body mass (μL.g ⁻¹)	0.93 ± 0.08	0.86 ± 0.12	0.97 ± 0.14	0.89 ± 0.10
RVESV/body mass (μL.g ⁻¹)	0.29 ± 0.04	0.37 ± 0.08	0.30 ± 0.06	0.35 ± 0.09
RVEF (%)	70 ± 3	63 ± 3	70 ± 2	66 ± 4
M5	n = 18	n = 20	n = 14	n = 15
LV mass/body mass (mg.g ⁻¹)	2.26 ± 0.14	2.43 ± 0.11	2.77 ± 0.14 †	2.86 ± 0.16 ‡
LVEDV/body mass (μL.g ⁻¹)	1.50 ± 0.18	1.63 ± 0.18	1.60 ± 0.15	1.68 ± 0.18
LVESV/body mass (μL.g ⁻¹)	0.52 ± 0.09	0.57 ± 0.10	0.62 ± 0.09	0.58 ± 0.10
LVEF (%)	68 ± 3	69 ± 3	62 ± 3	67 ± 3
RVEDV/body mass (μL.g ⁻¹)	0.36 ± 0.11	0.45 ± 0.09	0.52 ± 0.11	0.62 ± 0.15
RVESV/body mass (μL.g ⁻¹)	0.14 ± 0.06	0.11 ± 0.02	0.20 ± 0.07	0.16 ± 0.05
RVEF (%)	67 ± 2	72 ± 2	65 ± 4	71 ± 4

To evaluate the relation between morphological and functional irradiation-induced cusp remodeling, the maximal aortic valve jet velocity was plotted as a function of the surface of one cusp as well as the surface of the cusp and annulus (Figure 4). The Pearson's product moment correlation revealed r coefficients of 0.61 and 0.62, which correspond to $p < 0.001$, indicating a significant correlation.

Aortic sinus remodeling was evaluated on hearts sliced in the transversal axis to reveal the entirety of the sinus (Figure 5). The sinus area (tissue area) was not significantly different between Trpm4^{+/+} and Trpm4^{-/-} animals in the absence of irradiation. Irradiation induced an increase in aortic sinus area from Trpm4^{+/+} mice, even if not reaching significance, but not in Trpm4^{-/-} animals. No variation in sinus internal diameter was induced neither by gene disruption nor irradiation (Figure 5).

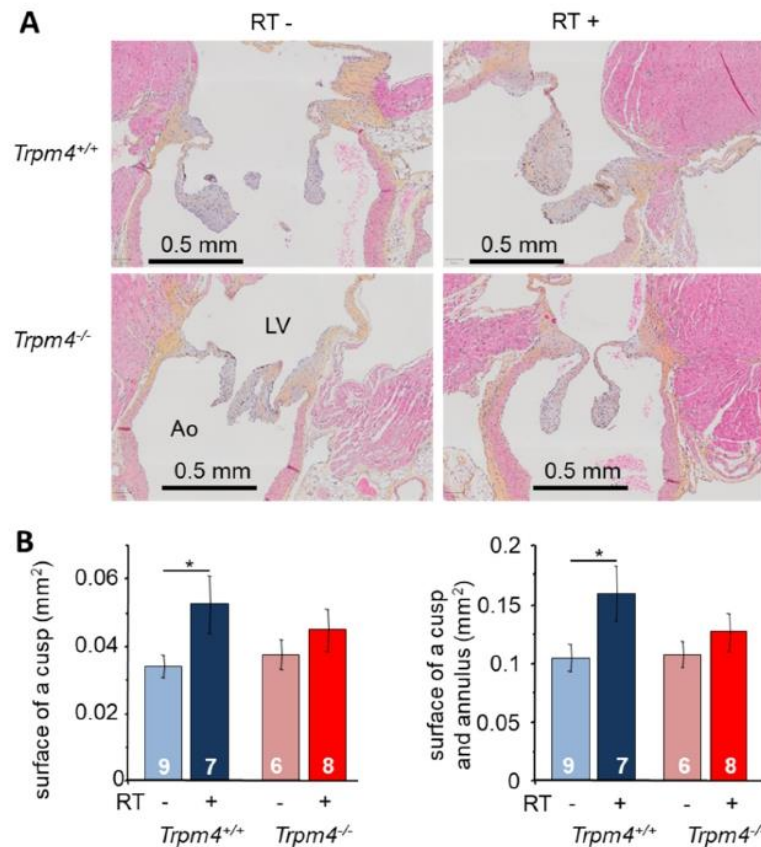


Figure 3. Morphological remodeling after irradiation: valvular remodeling after irradiation in the longitudinal axis. **(A)** Histological slice performed at 5 months post-treatment in the longitudinal axis (3 μm thickness) of the aortic valve representative for each group. The left ventricle (LV) is in the upper side and aorta (Ao) in the lower side. Slices were stained with hematoxylin, eosin, and saffron (HES) to reveal cell nuclei (blue) cytoplasm (pink) as well as collagen fibers (yellow). **(B)** The surface of a cusp (**left**) as well as the surface of a cusp and its annulus (**right**) were measured for each mouse. Histograms indicate the mean \pm S.E.M. for each group. * indicates a significant difference between groups ($p < 0.05$).

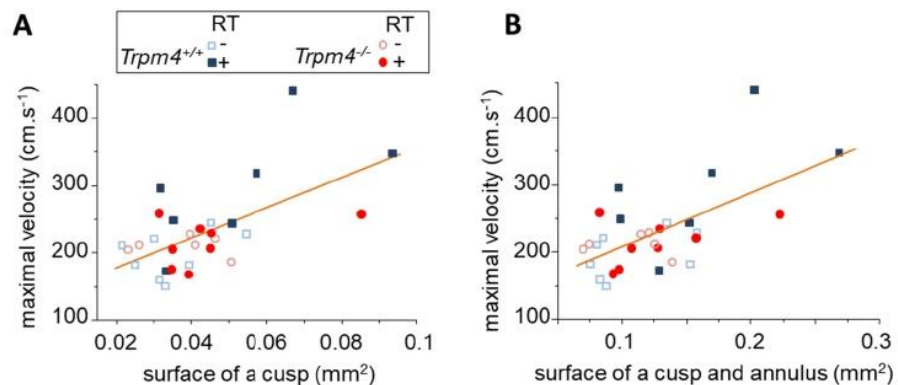


Figure 4. Morphological and functional remodeling relationship. For each mouse, the surface of an aortic valve cusp **(A)** as well as the surface of a cusp and annulus **(B)** were plotted to the maximal aortic valve jet velocity measured at 5 months post-treatment. Each group is represented by a different symbol as indicated in the legend. Altogether, the data were plotted to a linear regression indicating a significant relation between parameters. Pearson’s r was 0.61 for velocity/cusp and 0.62 for velocity/cusp + annulus.

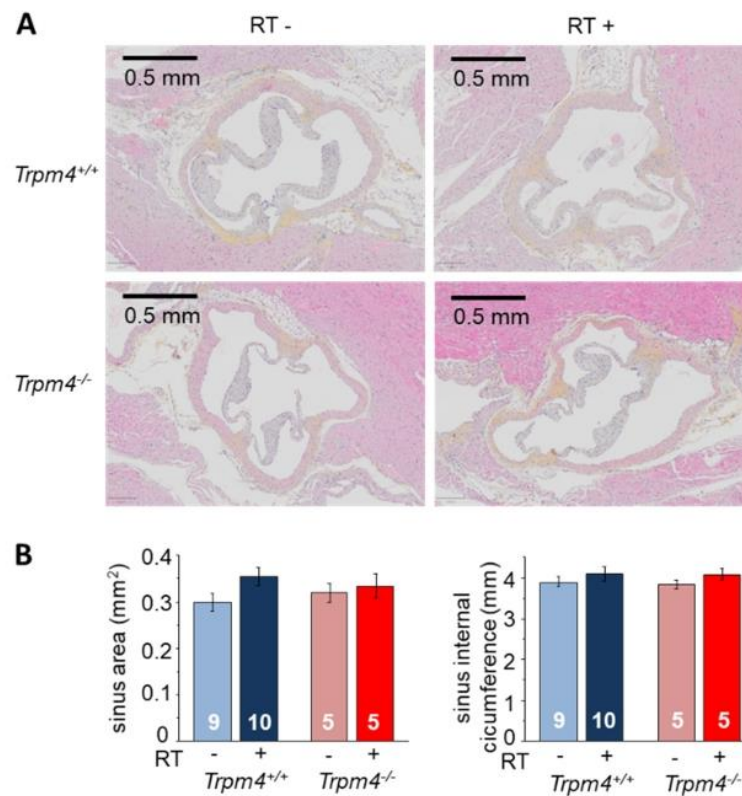


Figure 5. Morphological remodeling after irradiation: sinus remodeling in the transversal axis. **(A)** Histological slice performed at 5 months post-treatment in the transversal axis (3 μ m thickness) of the aortic valve representative for each group. Slices were stained with hematoxylin, eosin, and saffron (HES) to reveal cell nuclei (blue) cytoplasm (pink) as well as collagen fibers (yellow). **(B)** The sinus area (**left**) as well as the sinus internal circumference (**right**) was measured for each mouse. Histograms indicate the mean \pm S.E.M for each group.

3.3. Effect of Irradiation on Aortic Valve Fibrosis

Fibrosis was first evaluated by Sirius red staining on aortic valve cusps using longitudinal heart slices. Staining intensity in the cusp area was significantly increased by 38% in irradiated Trpm4^{+/+} mice compared to non-treated controls while no significant effect of irradiation was detected on Trpm4^{-/-} animals (Figure 6).

Fibrosis was also evaluated using Masson trichrome staining on transversal slices. Cusp as well as annulus labeling was increased in irradiated Trpm4^{+/+} mice even if not reaching significance while no effect of irradiation was observed on Trpm4^{-/-} animals (Figure 7). On the other hand, labeling of the sinus was significantly increased by 4-fold after irradiation in the Trpm4^{+/+} mice but no effect was detected in Trpm4^{-/-} animals (Figure 7).

To evaluate fibrotic remodeling on the atrium and ventricle, Sirius red staining was measured on the right atrial and upper left ventricular area using longitudinal heart slices. No significant difference was observed depending on genotype or irradiation (Figure 8). Fibrotic remodeling on the atrium and ventricle was also evaluated using Masson trichrome on transversal slices. Quantification of Masson trichrome labeling on atrial as well as ventricular sections in the vicinity of the valve did not reveal any effect of irradiation. Green intensity labeling (in arbitrary unit) was 21.8 ± 8.4 ($n = 9$) and 24.3 ± 8.9 ($n = 10$) at the atrial level for Trpm4^{+/+} RT- and RT+ animals, respectively. It was 11.1 ± 5.7 ($n = 9$) and 12.9 ± 5.2 ($n = 10$) at the ventricular level for Trpm4^{+/+} RT- and RT+ animals, respectively.

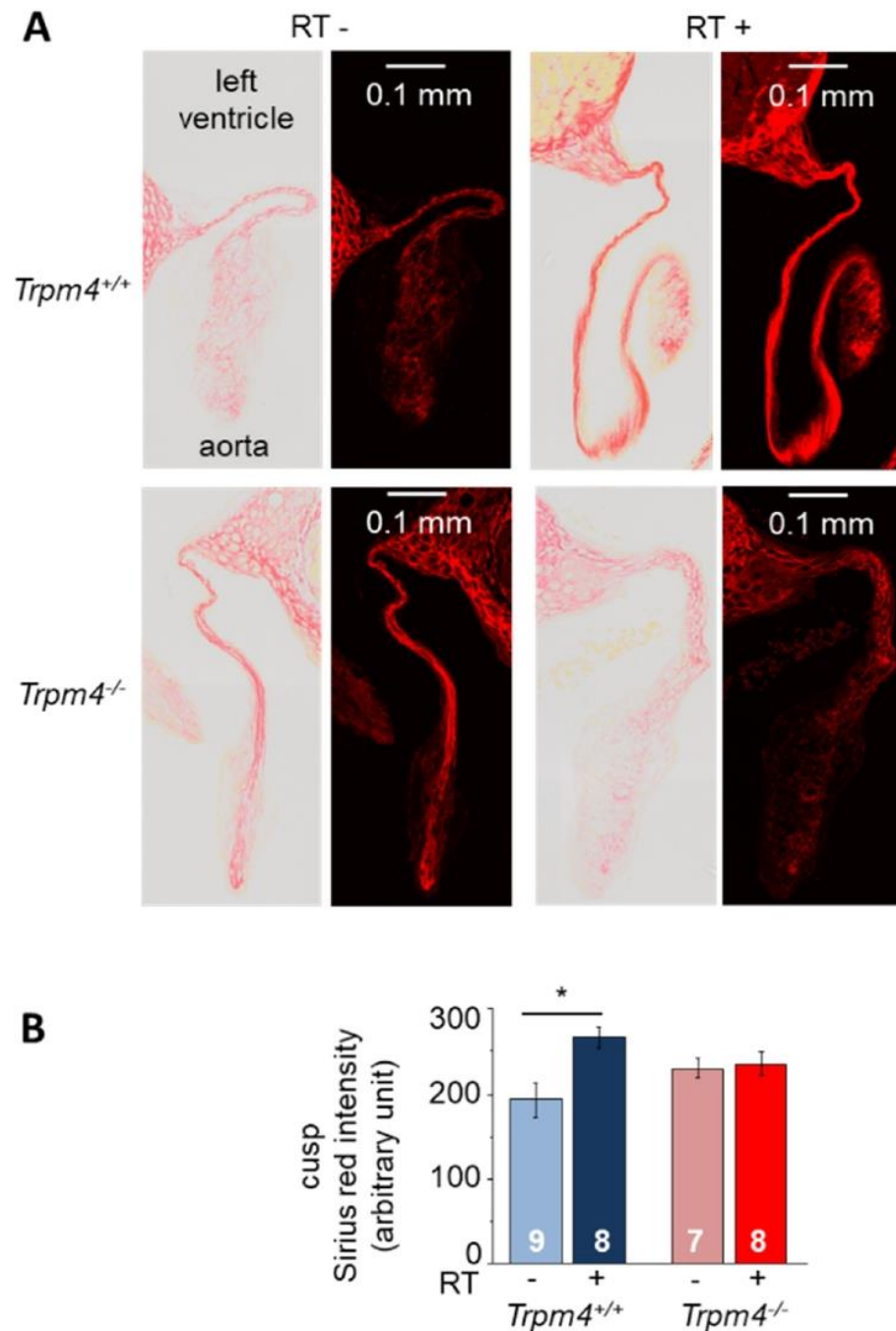


Figure 6. Effect of irradiation on valvular cusp fibrosis. **(A)** Histological slices performed at 5 months post-treatment in the longitudinal axis (3 μ m thickness) of the aortic valve representative for each group, stained with Sirius red to reveal fibrosis. For each group, the figure shows the original image with full colors (**left panel**) and the same image with only red chromaticity (see methods) to precisely isolate Sirius red staining. For each panel, the left ventricle is on the upper side and the aorta on the lower side. **(B)** Cusp red chromaticity intensity for each group in arbitrary units (see methods for quantification protocol). Histograms indicate the mean \pm S.E.M. for each group. * indicates a significant difference between groups ($p < 0.05$).

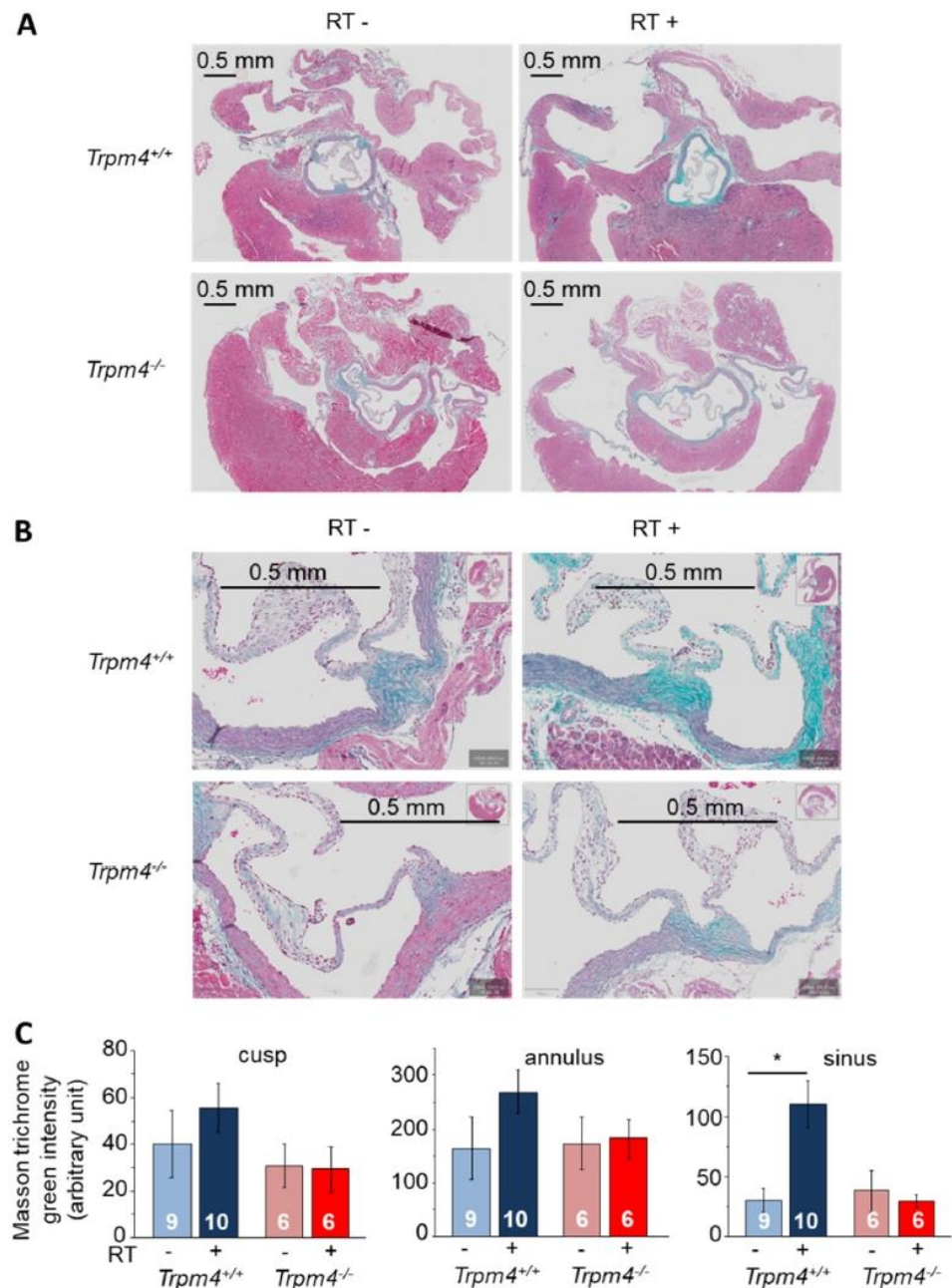


Figure 7. Effect of irradiation on aortic valve fibrosis using Masson trichrome staining. **(A,B)** Histological slices performed at 5 months post-treatment in the transversal axis (3 μ m thickness) of the aortic valve representative for each group, stained with Masson trichrome to reveal fibrosis. Images in A represent the whole transversal section of hearts while images in B represent a magnification of the same hearts in the aortic valve area. **(C)** Valvular green chromaticity intensity after Masson trichrome staining for each group in arbitrary units (see methods for quantification protocol). Data were measured for the cusp (**left histogram**), annulus (middle histogram), and sinus (**right histogram**). Data indicate the mean \pm S.E.M. for each group. * indicates a significant difference between groups ($p < 0.05$).

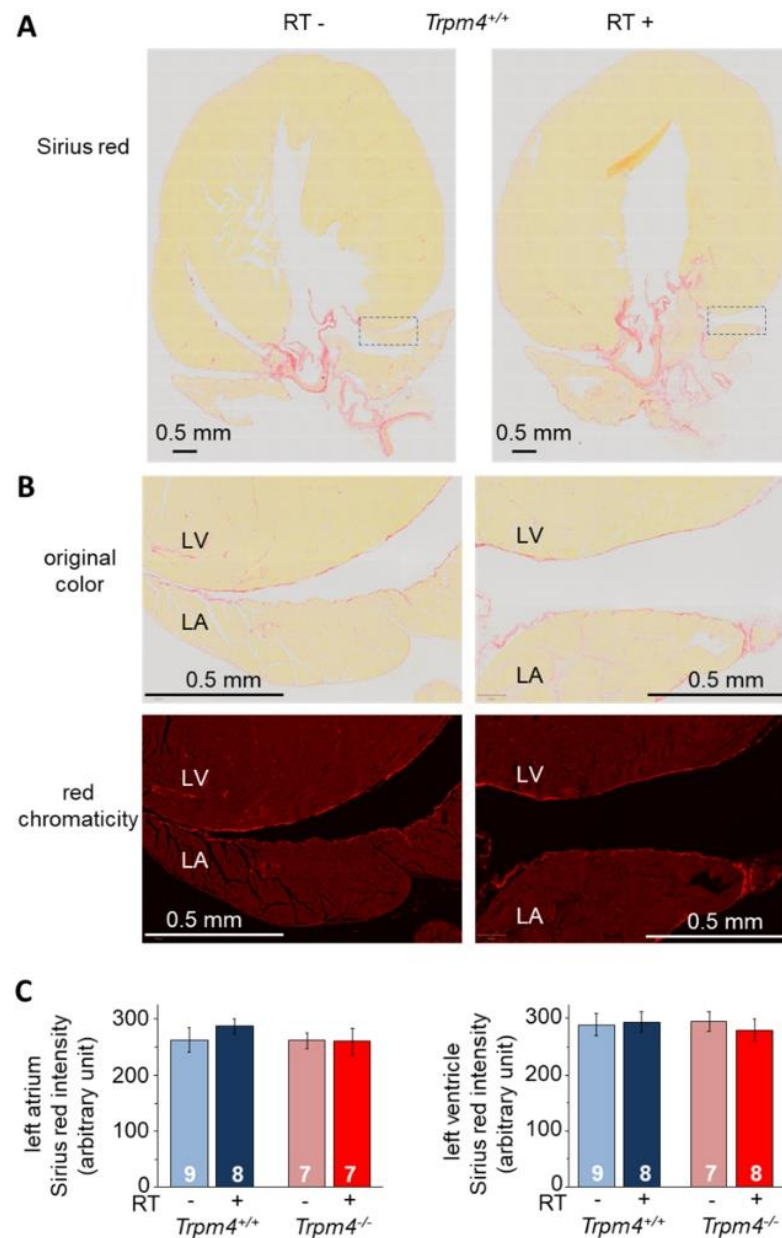


Figure 8. No effect of irradiation on atrial and ventricular fibrosis. (A) Histological slices performed at 5 months post-treatment in the longitudinal axis (3 μ m thickness) of the whole heart for representative RT– and RT+ *Trpm4^{+/+}* animals. Slices were stained with Sirius red to reveal fibrosis. (B) Magnification of the area indicated in A by dotted lines to reveal the left atrium and ventricle. The upper images are in full color while the bottom images are shown in red chromaticity mode (see methods) to precisely isolate Sirius red staining. For each image, the left ventricle (LV) is on the upper side while the left atrium (LA) is on the lower side. (C) The left atrium (left) and left ventricle (right) red chromaticity intensity after Sirius red staining for each group in arbitrary units (see methods for quantification protocol). Data indicate the mean \pm S.E.M. for each group.

3.4. Effect of Irradiation on Aortic Valve Calcification

Aortic valve calcification was assessed with alizarin red staining on cusps using longitudinal heart slices. No significant red labeling was detected on cusps or annulus, regardless of genotype or irradiation (see Figure 9 for *Trpm4^{+/+}* mice). As a control of calcification staining, an example of stained cartilage from a bronchus is provided in Figure 9. The lack

of calcification induced by gene disruption or irradiation was confirmed by Von Kossa staining (Figure 9). Note that in alizarin red as well as Von Kossa staining experiments, brown labeling was detected and attributed to melanocytes staining as previously reported in such preparation [22].

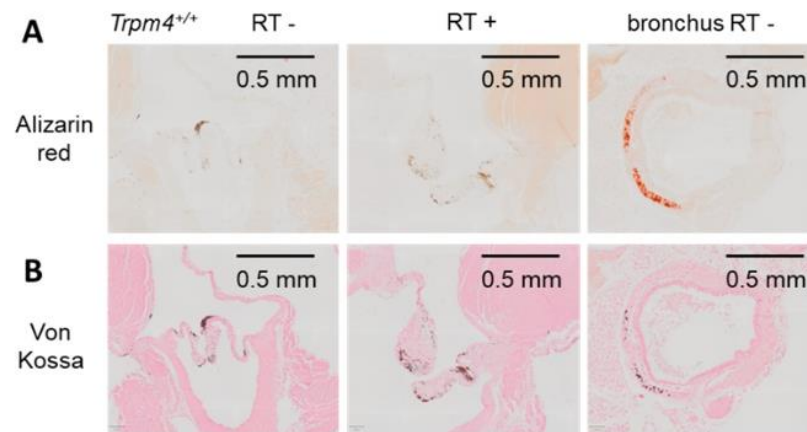


Figure 9. No valvular calcification induced by irradiation. Histological slices performed at 5 months post-treatment in the longitudinal axis ($3\ \mu\text{m}$ thickness) of the aortic valve representative for $\text{Trpm4}^{+/+}$ mice after radiation treatment or not (**left and middle images**). The right images present a slice which includes a bronchus with cartilage as a control of calcified tissue. (**A**) Slices stained with alizarin red. Red labeling appears in the cartilage from the bronchus but no red staining was detectable on valvular cusps. Note that brown labeling is most likely attributable to melanocytes. (**B**) Slices of the same hearts as in A, stained with Von Kossa.

3.5. Tricuspid and Bicuspid Aortic Valves in $\text{Trpm4}^{-/-}$ Mice

Aortic valve transversal slices allow to determine the number of cusps. All $\text{Trpm4}^{+/+}$ mice ($n = 19$) exhibited tricuspid valves whereas 2 over 12 $\text{Trpm4}^{-/-}$ mice exhibited bicuspid instead of tricuspid aortic valves. Examples of such valves are provided Figure 10.

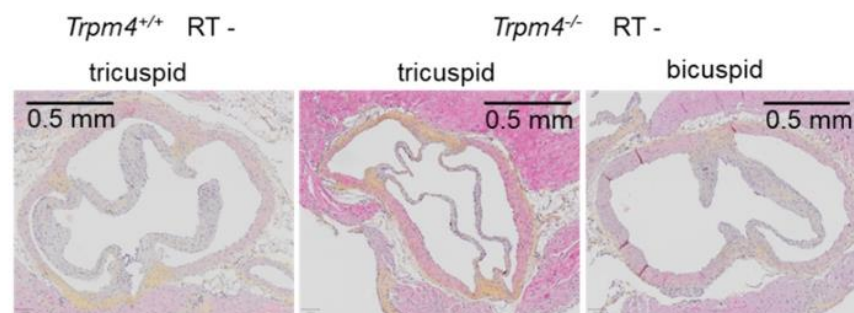


Figure 10. Tricuspid and bicuspid aortic valves in $\text{Trpm4}^{-/-}$ mice.

Histological slices performed at 5 months post-treatment in the transversal axis ($3\ \mu\text{m}$ thickness) of the aortic valve for non-irradiated $\text{Trpm4}^{+/+}$ mice and $\text{Trpm4}^{-/-}$ mice. Left image shows a tricuspid aortic valve representative for $\text{Trpm4}^{+/+}$ mice. Other images represent the heterogeneity of valves in $\text{Trpm4}^{-/-}$ mice with either tricuspid (middle image) or bicuspid (right image) aortic valves. Slices were stained with hematoxylin and eosin (HES).

4. Discussion

Our data indicate that specific irradiation targeting the aortic valve area induces a morphological remodeling leading to a functional remodeling of this valve which is

prevented by *Trpm4* gene disruption. The TRPM4 channel therefore appears as a participant in the process linking irradiation to aortic stenosis.

Our animal model of valvular irradiation reproduces several types of valvular damage observed in patients after radiotherapy (stenosis and fibrosis) [2]. The specific targeting of the aortic valve in our model differs from previously reported studies in mice in which either the entire heart or even animal was irradiated [23,24] or the beam was restricted to the ventricular apex [25]. This is a specificity of our study since a recent review reported that among 159 studies using models of irradiation-induced cardiac remodeling in rodents, only 4% targeted a restricted area of the heart while others undertook whole heart or whole animal irradiation [26]. Some of these studies in mice with specific irradiation of the heart revealed an increase in fibrosis detected by Masson trichrome staining, observed at 5 months at the ventricular level [23,25], which was also reported in rats [27]. Interestingly, in our study, we did not observe such fibrosis neither at the ventricular level nor at the atrial level, while it was present in valvular structures, consistent with a specific targeting of the valve. Our functional recordings using cardiac magnetic resonance imaging revealed a ventricular hypertrophy without modification of the ejection fraction in *Trpm4*^{-/-} animals compared to *Trpm4*^{+/+} mice, in accordance with previous observations made using echography measurements in this mouse strain [14,21]. No effect of irradiation was observed on these ventricular parameters. According to this, the functional effects that we observed on the maximal aortic valve jet velocity and mean transaortic pressure gradient most probably occur following valvular remodeling rather than ventricular remodeling.

Even if our data demonstrate that valve irradiation leads to fibrosis and that TRPM4 participates in the phenomenon, the molecular mechanisms as well as cell types affected by ionizing radiation remain to be identified. Following the acute stage of irradiation-induced cardiac remodeling characterized by endothelial dysfunction and inflammation, the chronic stage is mainly characterized by persistent fibrosis as we observed at 5 months in our model. Signaling involving transforming growth-factor (TGF- β 1) which is known to stimulate transformation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts and collagen synthesis [28] might be an interesting pathway to evaluate in the irradiation-induced fibrosis that we observed since increased TGF- β 1 signaling occurs weeks after radiotherapy [29]. The classical TGF- β 1 signaling pathway includes its binding to type I and II receptors inducing phosphorylation of Smad transcription factors leading to extracellular matrix gene activation [30]. Connective tissue growth factor (CTGF) activation may also participate as it is known to be a downstream mediator of the TGF- β 1-induced activation of fibroblasts [30]. Evidence indicates that CTGF participates in the differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts after induction by TGF- β 1 and its expression is essential for persistent fibrosis [31]. CTGF expression is known to be sensitive to Ca²⁺-homeostasis through Ca²⁺-calcineurin-NFAT pathway [32]. This might be a linker for the implication of TRPM4. Indeed, TRPM4 was shown to be indirectly involved in the regulation of the calcineurin-NFAT pathway in a model of pressure-overload-induced cardiac hypertrophy in mice [16]. In this model, the calcineurin-NFAT pathway is inhibited by CaMKII under the regulation of TRPM4. Note that the authors also reported that *Trpm4* gene disruption results in a reduction in pressure-overload-induced cardiac fibrosis [16]. Interestingly, TRPM4 expression in human ventricular fibroblasts in culture was increased after TGF- β incubation [33] and this was also observed on mouse atrial fibroblasts in culture [34]. Specific data also suggest that the TGF- β 1 and CTGF pathways might be independent. Indeed, irradiation of the whole heart of C57Bl6 mice revealed Rho activation at 20 weeks after treatment followed by an increase in CTGF and extracellular matrix deposition at 40 weeks but without detectable variation of TGF- β 1 [35].

Metabolism-related proteins may also be involved in irradiation-induced remodeling. To support this hypothesis, it was shown that cardiac mitochondrial respiratory capacity was reduced 40 weeks after cardiac irradiation in mice at 2 Gy [36]. Note that this was confirmed in a recent study in mice after heart irradiation at 16 Gy which induces an increase in extracellular matrix proteins and variation in metabolism-related proteins

detectable after 5 months, a time similar to that used in our study [23]. Dysregulation of the metabolism status with modification of ATP levels may impact TRPM4 in two different ways. First, by modifying Ca^{2+} -homeostasis which is a strong regulator of TRPM4 but also because TRPM4 is sensitive to intracellular ATP [37].

Another candidate to link irradiation, TRPM4, and fibrosis may implicate the oxidative status. Indeed, irradiation leads to reactive oxygen species generation (ROS) which is particularly observed in radiation-induced fibrosis [38]. Ionizing radiation interacts with water molecules leading to the production of ROS, in which the high level persists a long time after exposure through induction of mitochondrial dysfunction, participating in late side effects. The implication of TRPM4 in ROS level increase and/or ROS-induced damage was shown in several models. It was recently observed on an adenocarcinoma cell line LS174T that knockdown of *TRPM4* depresses ROS generation [39]. At the cardiac level, hydrogen peroxide (H_2O_2) increases ROS production as well as intracellular Ca^{2+} level in an H9c2 rat cardiomyocyte cell line, which was prevented by *Trpm4* gene disruption [40]. This implication of TRPM4 was also observed in endothelial cells. In particular, TRPM4 favors H_2O_2 enhanced migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [41]. This effect might occur through a modulation of TRPM4 biophysical properties. Indeed, it was shown in a heterologous expression system that H_2O_2 increases sustained TRPM4 current by reducing its desensitization [42]. It could also occur through gene overexpression since H_2O_2 treatment causes an increase in TRPM4 expression in HUVECs [43]. Note that TRPM4 was detected in various types of endothelial cells including: at the mRNA level, human pulmonary arteries endothelial cells [44]; at the protein level, mouse aortic endothelial cells [45]; at the functional level, HUVEC [46] as well as mouse and human brain endothelial cells [47]. According to these results, valvular endothelial cells which cover the valvular cusps might be affected by irradiation.

In addition, valvular interstitial cells which are the main cell type in the cusps might also be affected by irradiation since they produce extracellular matrix, thus, participating in fibrosis. Data on the irradiation effect on valvular interstitial cells are sparse. Porcine valvular interstitial cells in 2D as well as 3D cultures subjected to irradiation were shown to undo a transition from the myofibroblastic to the osteoblastic phenotypes associated with calcification, and DNA damage leading to a decrease in cell viability [48]. Another study reported that irradiation of human valvular interstitial cells in culture induced an increase in osteogenic factors within 24 h [49]. Human valvular interstitial cells were shown to express a low level of TRPM4 protein [17] but no functional channel was reported yet. However, more generally, TRPM4 is known to be expressed in the fibroblast family to which valvular interstitial cells belong. In particular, it is functionally expressed in human as well as mouse atrial fibroblasts [7]. Application of 9-phenanthrol, a TRPM4 inhibitor [50], during culture of human atrial fibroblasts, reduces their growth [7]. Moreover, the transition from atrial fibroblasts to myofibroblasts was reduced in *Trpm4*^{-/-} compared to *Trpm4*^{+/+} mice cells in culture [7]. It indicates that TRPM4 participates in this transition which is known to occur during valvular stenosis when quiescent valvular interstitial cells differentiate into myofibroblasts enhancing extracellular matrix production. Interestingly, it was recently shown that *Trpm4* gene disruption, specifically in cardiomyocytes, results in a reduction in ventricular fibrosis induced by transverse aortic constriction in mice [16], indicating that TRPM4 also participates in cardiac fibrosis through those cells.

In addition to endothelial cells and fibroblasts, cardiomyocytes might also be involved since these cells are known to functionally express TRPM4 [13] and be sensitive to irradiation [35]. However, as described above, since we did not detect variations in functional and morphological ventricular parameters after irradiation, we hypothesized that cardiomyocytes are not the main cell actor in our model with specific valvular targeting.

Beside the effect of irradiation, a learning from our study is the absence of significant aortic valve dysfunction in *Trpm4*^{-/-} mice, since these animals have cusp surface and aortic flux parameters similar to the wild type. Note that valvular morphological parameters measured for wild-type mice in our study were similar to those previously reported for

animals of the same age (9 months) in another study [22]. However, it is intriguing that in our experiments where transversal slicing was performed, we detected 2 *Trpm4*^{-/-} mice with apparent bicuspid aortic valve over the 12 animals used (17%) while none were detected over the 19 *Trpm4*^{+/+} mice. According to the small number of animals, it does not reach significance, however, a recent review of the literature based on 1823 mice reported that a bicuspid aortic valve in mice occurs in only 0.3% of wild-type animals [51]. Even more, specifically in the studies using C57BL/6 mice similar to the strain used in our study, only 2/366 animals exhibited bicuspid aortic valves [51,52]. It thus indicates that the bicuspid valve is rare in C57BL/6 mice. This occurrence (2/366) is significantly different from that observed in *Trpm4*^{-/-} mice from our study (2/12), according to the Fisher exact test. It is thus conceivable that TRPM4 participates in the development of the aortic valve even if this remains to be confirmed in a larger population. This is, to our knowledge, the first description of valvular malformation in *Trpm4*^{-/-} mice.

A limitation of our study comes from the so called “long-term” effect which is, in our protocol, evaluated at 5 months while, in human, valvular dysfunctions occur within years or decades after radiation therapy in patients [1]. However, it is known that the first detectable signs of irradiation-induced fibrosis in humans begins 4–12 months after radiation therapy, then develops in the following years [38]. Our study may thus represent the initial step of valvular remodeling. It is conceivable that it could lead to calcification after additional months. In addition, a strength of our study is the evaluation of the in-vivo effect of irradiation instead of in vitro studies, allowing a better appreciation of long-term effects observed in patients treated with radiotherapy since it was reported that effects of irradiation performed in vivo are stronger than those observed in vitro on cell culture [53]. Regarding irradiation intensity, the single dose of 10 Gy that we used in our study was under the median physical dose (16 Gy) used in in vivo studies evaluating cardiac radiotoxicity in rodents [26] but might be difficult to extrapolate to doses used during radiotherapy in cancer treatment. Indeed, a discrepancy may appear between a single dose treatment that we applied and repeated treatments as observed in human medicine. Such unique dose proceeding is used in the vast majority of studies (85%) evaluating cardiac radiotoxicity in rodents [26]. Note that non-irradiated mice were not subjected to a sham irradiation in our study. However, since these mice were also subjected to anesthesia for echography and cardiac MRI, one can consider that the effect observed in irradiated mice can be attributed to irradiation rather than the anesthesia protocol. Another limitation came by the fact that our study was performed only on male mice. This choice was made since males are known to be more prone to valvular stenosis with a twofold excess risk compared to females in humans [54]. However, females are also known to develop aortic stenosis after radiation treatment, for example, in the case of breast cancers. According to this, it is probable that our data would also be observed in females even if this remains to be explored.

It is also difficult to predict what the effect of TRPM4 inhibition would be in vivo if this is used to prevent radiotherapy-induced valvular damage. Indeed, TRPM4 has a large distribution in tissues and contributes to numerous physiological processes including cardiac electrical activity [9,13]. At present, very few TRPM4 inhibitors are available and only two studies reported the effect of in vivo acute application of the TRPM4 inhibitors: one with 9-phenanthrol injected in rats which results in reduction in arterial pressure and heart rate [55]; another with meclofenamate injected in mice which results in QTc reduction on an ECG [56].

5. Conclusions

Our study identifies TRPM4 as an actor of the irradiation-induced aortic valve damage. However, the mechanisms and even the cell types involved in the phenomenon are unknown and must be described before elaborating any therapeutic strategies to prevent radiotherapy side effects. Regarding the implication of TRPM4 in the cardiovascular sys-

tem, our study revealed an implication in aortic valve remodeling, indicating that it could be valuable to investigate its potential role in other aortic valve dysfunctions.

Author Contributions: Conceptualization, R.G., C.S., A.M. and STOP-AS Investigators; methodology, R.G., C.S., H.M.B. and A.M.; validation, R.G. and A.M.; investigation, H.M.B., C.S., M.A., A.L., A.M. and R.G.; data curation, H.M.B. and R.G.; writing—original draft preparation, R.G.; writing—review and editing, R.G., H.M.B.; supervision, R.G.; project administration, R.G.; funding acquisition, R.G., C.S. and A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the French Government, managed by the National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’avenir” with the reference ANR-16-RHUS-0003, and was conducted as part of the FHU CARNAVAL project (GSC G4).

Institutional Review Board Statement: Experiments were carried out in strict accordance with the European Commission Directive 2010/63/EU for animal care. They were conducted with authorization for animal experimentation by the French “ministère de l’enseignement supérieur de la recherche et de l’innovation” referral APAFIS#23869-2020012911013146 v6 (approved date: 19 June 2020). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The dataset generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We thank Marie Demion (INSERM U1046, Montpellier, France) for providing the mouse strain used in this study. We are grateful to Nicolas Elie, Maëlle Guyot, and Gwenaëlle Levallet (VIRTUAL/HIS, Caen-France) for their expert technical support in the histological proceedings. We thank the French National Agency for Research ‘Investissement d’Avenir” n° ANR-10-EQPX1401 for the access to the micro-irradiator. We thank Beryl Guinamard for the English editing of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sárközy, M.; Varga, Z.; Gáspár, R.; Szűcs, G.; Kovács, M.G.; Kovács, Z.Z.A.; Dux, L.; Kahán, Z.; Csont, T. Pathomechanisms and therapeutic opportunities in radiation-induced heart disease: From bench to bedside. *Clin. Res. Cardiol.* **2021**, *110*, 507–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gujral, D.M.; Lloyd, G.; Bhattacharyya, S. Radiation-induced valvular heart disease. *Heart* **2016**, *102*, 269–276. [[CrossRef](#)]
3. Cutter, D.J.; Schaapveld, M.; Darby, S.C.; Hauptmann, M.; van Nimwegen, F.A.; Krol, A.D.; Janus, C.P.; van Leeuwen, F.E.; Aleman, B.M. Risk of valvular heart disease after treatment for Hodgkin lymphoma. *J. Natl. Cancer. Inst.* **2015**, *107*, djv008. [[CrossRef](#)]
4. Heidenreich, P.A.; Hancock, S.L.; Lee, B.K.; Mariscal, C.S.; Schnittger, I. Asymptomatic cardiac disease following mediastinal irradiation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2003**, *42*, 743–749. [[CrossRef](#)]
5. Lee, M.S.; Finch, W.; Mahmud, E. Cardiovascular complications of radiotherapy. *Am. J. Cardiol.* **2013**, *112*, 1688–1696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yarnold, J.; Brotons, M.-C.V. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother. Oncol.* **2010**, *97*, 149–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Simard, C.; Magaud, C.; Adjlane, R.; Dupas, Q.; Sallé, L.; Manrique, A.; Bois, P.; Faivre, J.F.; Guinamard, R. TRPM4 non-selective cation channel in human atrial fibroblast growth. *Pflugers Arch.* **2020**, *472*, 1719–1732. [[CrossRef](#)]
8. Hof, T.; Chaigne, S.; Récalde, A.; Sallé, L.; Brette, F.; Guinamard, R. Transient receptor potential channels in cardiac health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**, *16*, 344–360. [[CrossRef](#)]
9. Dienes, C.; Kovács, Z.M.; Hézső, T.; Almássy, J.; Magyar, J.; Bányász, T.; Nánási, P.P.; Horváth, B.; Szentandrassy, N. Pharmacological Modulation and (Patho)Physiological Roles of TRPM4 Channel-Part 2: TRPM4 in Health and Disease. *Pharmaceuticals* **2021**, *15*, 40. [[CrossRef](#)]
10. Fliegert, R.; Glassmeier, G.; Schmid, F.; Cornils, K.; Genisyuerek, S.; Harneit, A.; Schwarz, J.R.; Guse, A.H. Modulation of Ca²⁺ entry and plasma membrane potential by human TRPM4b. *FEBS J.* **2007**, *274*, 704–713. [[CrossRef](#)]
11. Diszházi, G.; Magyar, Z.É.; Lisztes, E.; Tóth-Molnár, E.; Nánási, P.P.; Vennekens, R.; Tóth, B.I.; Almássy, J. TRPM4 links calcium signaling to membrane potential in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 101015. [[CrossRef](#)]
12. Launay, P.; Cheng, H.; Srivatsan, S.; Penner, R.; Fleig, A.; Kinet, J.-P. TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science* **2004**, *306*, 1374–1377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Guinamard, R.; Bouvagnet, P.; Hof, T.; Liu, H.; Simard, C.; Sallé, L. TRPM4 in cardiac electrical activity. *Cardiovasc. Res.* **2015**, *108*, 21–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Demion, M.; Thireau, J.; Gueffier, M.; Finan, A.; Khoueiry, Z.; Cassan, C.; Serafini, N.; Aimond, F.; Granier, M.; Pasquié, J.-L.; et al. Trpm4 gene inactivation leads to cardiac hypertrophy and electrophysiological alterations. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e115256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gueffier, M.; Zintz, J.; Lambert, K.; Finan, A.; Aimond, F.; Chakouri, N.; Hédon, C.; Granier, M.; Launay, P.; Thireau, J.; et al. The TRPM4 channel is functionally important for the beneficial cardiac remodeling induced by endurance training. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **2017**, *38*, 3–16. [[CrossRef](#)]
16. Guo, Y.; Yu, Z.Y.; Wu, J.; Gong, H.; Kesteven, S.; Iismaa, S.E.; Chan, A.Y.; Holman, S.; Pinto, S.; Pironet, A.; et al. The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is a positive regulator of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *eLife* **2021**, *10*, e66582. [[CrossRef](#)]
17. Al-Shammari, H.; Latif, N.; Sarathchandra, P.; McCormack, A.; Rog-Zielinska, E.A.; Raja, S.; Kohl, P.; Yacoub, M.H.; Peyronnet, R.; Chester, A.H. Expression and function of mechanosensitive ion channels in human valve interstitial cells. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0240532. [[CrossRef](#)]
18. Barbet, G.; Demion, M.; Moura, I.C.; Serafini, N.; Léger, T.; Vrtovsniak, F.; Monteiro, R.C.; Guinamard, R.; Kinet, J.P.; Launay, P. The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1148–1156. [[CrossRef](#)]
19. Joubert, M.; Tager, P.; Legallois, D.; Defourneaux, E.; Le Guellec, B.; Gerber, B.; Morello, R.; Manrique, A. Test-retest reproducibility of cardiac magnetic resonance imaging in healthy mice at 7-Tesla: Effect of anesthetic procedures. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6698. [[CrossRef](#)]
20. Bankhead, P.; Loughrey, M.B.; Fernández, J.A.; Dombrowski, Y.; McArt, D.G.; Dunne, P.D.; McQuaid, S.; Gray, R.T.; Murray, L.J.; Coleman, H.G.; et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16878. [[CrossRef](#)]
21. Simard, C.; Ferchaud, V.; Sallé, L.; Milliez, P.; Manrique, A.; Alexandre, J.; Guinamard, R. TRPM4 Participates in Aldosterone-Salt-Induced Electrical Atrial Remodeling in Mice. *Cells* **2021**, *10*, 636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hinton, R.B., Jr.; Alfieri, C.M.; Witt, S.A.; Glascock, B.J.; Khoury, P.R.; Benson, D.W.; Yutzey, K.E. Mouse heart valve structure and function: Echocardiographic and morphometric analyses from the fetus through the aged adult. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2008**, *294*, H2480–H2488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Xu, P.; Yi, Y.; Luo, Y.; Liu, Z.; Xu, Y.; Cai, J.; Zeng, Z.; Liu, A. Radiation induced dysfunction of energy metabolism in the heart results in the fibrosis of cardiac tissues. *Mol. Med. Rep.* **2021**, *24*, 842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wang, Z.; Jia, Z.; Zhou, Z.; Zhao, X.; Wang, F.; Zhang, X.; Tse, G.; Li, G.; Liu, Y.; Liu, T. Long-Term Cardiac Damage Associated With Abdominal Irradiation in Mice. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 850735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dreyfuss, A.D.; Goia, D.; Shoniyozov, K.; Shewale, S.V.; Velalopoulou, A.; Mazzoni, S.; Avgousti, H.; Metzler, S.D.; Bravo, P.E.; Feigenberg, S.J.; et al. A Novel Mouse Model of Radiation-Induced Cardiac Injury Reveals Biological and Radiological Biomarkers of Cardiac Dysfunction with Potential Clinical Relevance. *Clin. Cancer Res.* **2021**, *27*, 2266–2276. [[CrossRef](#)]
26. Walls, G.M.; O’Kane, R.; Ghita, M.; Kuburas, R.; McGarry, C.K.; Cole, A.J.; Jain, S.; Butterworth, K.T. Murine models of radiation cardiotoxicity: A systematic review and recommendations for future studies. *Radiother. Oncol.* **2022**, *173*, 19–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sárközy, M.; Gáspár, R.; Zvara, Á.; Kiscsatári, L.; Varga, Z.; Kóvári, B.; Kovács, M.G.; Szűcs, G.; Fábíán, G.; Diószegi, P.; et al. Selective Heart Irradiation Induces Cardiac Overexpression of the Pro-hypertrophic miR-212. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 598. [[CrossRef](#)]
28. Swaney, J.S.; Roth, D.M.; Olson, E.R.; Naugle, J.E.; Meszaros, J.G.; Insel, P.A. Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 437–442. [[CrossRef](#)]
29. Barker, H.E.; Paget, J.T.; Khan, A.A.; Harrington, K.J. The tumour microenvironment after radiotherapy: Mechanisms of resistance and recurrence. *Nat. Rev. Cancer.* **2015**, *15*, 409–425. [[CrossRef](#)]
30. Wang, B.; Wang, H.; Zhang, M.; Ji, R.; Wei, J.; Xin, Y.; Jiang, X. Radiation-induced myocardial fibrosis: Mechanisms underlying its pathogenesis and therapeutic strategies. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 7717–7729. [[CrossRef](#)]
31. Lipson, K.E.; Wong, C.; Teng, Y.; Spong, S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* **2012**, *5*, S24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lin, W.; Shi, C.; Wang, W.; Wu, H.; Yang, C.; Wang, A.; Shen, X.; Tian, Y.; Cao, P.; Yuan, W. Osmolarity and calcium regulate connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in nucleus pulposus cells. *Gene* **2019**, *704*, 15–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Feng, J.; Zong, P.; Yan, J.; Yue, Z.; Li, X.; Smith, C.; Ai, X.; Yue, L. Upregulation of transient receptor potential melastatin 4 (TRPM4) in ventricular fibroblasts from heart failure patients. *Pflugers Arch.* **2021**, *473*, 521–531. [[CrossRef](#)]
34. Du, J.; Xie, J.; Zhang, Z.; Tsujikawa, H.; Fusco, D.; Silverman, D.; Liang, B.; Yue, L. TRPM7-mediated Ca²⁺ signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 992–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Monceau, V.; Llach, A.; Azria, D.; Bridier, A.; Petit, B.; Mazevet, M.; Strup-Perrot, C.; To, T.H.; Calmels, L.; Germaini, M.M.; et al. Epac contributes to cardiac hypertrophy and amyloidosis induced by radiotherapy but not fibrosis. *Radiother. Oncol.* **2014**, *111*, 63–71. [[CrossRef](#)]
36. Barjaktarovic, Z.; Shyla, A.; Azimzadeh, O.; Schulz, S.; Haagen, J.; Dörr, W.; Sarioglu, H.; Atkinson, M.J.; Zischka, H.; Tapio, S. Ionising radiation induces persistent alterations in the cardiac mitochondrial function of C57BL/6 mice 40 weeks after local heart exposure. *Radiother. Oncol.* **2013**, *106*, 404–410. [[CrossRef](#)]
37. Nilius, B.; Prenen, J.; Voets, T.; Droogmans, G. Intracellular nucleotides and polyamines inhibit the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4b. *Pflugers Arch.* **2004**, *448*, 70–75. [[CrossRef](#)]

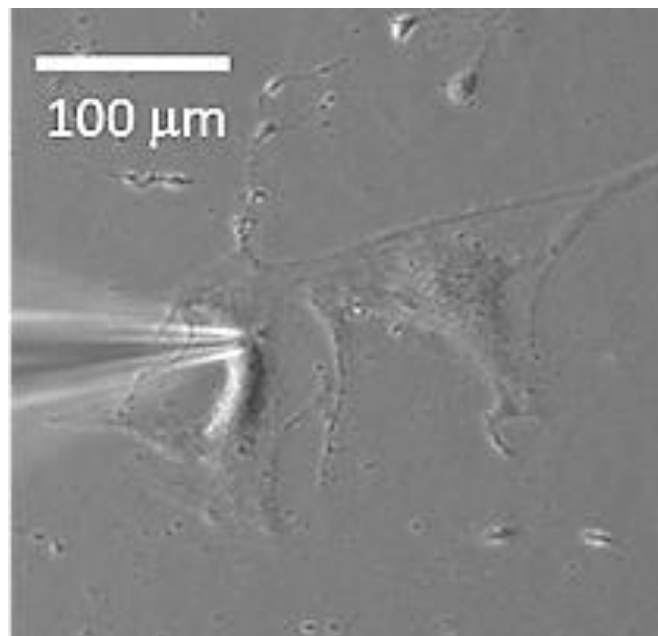
38. Straub, J.M.; New, J.; Hamilton, C.D.; Lominska, C.; Shnyder, Y.; Thomas, S.M. Radiation-induced fibrosis: Mechanisms and implications for therapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2015**, *141*, 1985–1994. [[CrossRef](#)]
39. Zhu, L.; Miao, B.; Dymerska, D.; Kuswik, M.; Bueno-Martínez, E.; Sanoguera-Miralles, L.; Velasco, E.A.; Paramasivam, N.; Schlesner, M.; Kumar, A.; et al. Germline Variants of CYBA and TRPM4 Predispose to Familial Colorectal Cancer. *Cancers* **2022**, *14*, 670. [[CrossRef](#)]
40. Wang, C.; Chen, J.; Wang, M.; Naruse, K.; Takahashi, K. Role of the TRPM4 channel in mitochondrial function, calcium release, and ROS generation in oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *566*, 190–196. [[CrossRef](#)]
41. Sarmiento, D.; Montorfano, I.; Cerda, O.; Cáceres, M.; Becerra, A.; Cabello-Verrugio, C.; Elorza, A.A.; Riedel, C.; Tapia, P.; Velásquez, L.A.; et al. Increases in reactive oxygen species enhance vascular endothelial cell migration through a mechanism dependent on the transient receptor potential melastatin 4 ion channel. *Microvasc. Res.* **2015**, *98*, 187–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Simon, F.; Leiva-Salcedo, E.; Armisen, R.; Riveros, A.; Cerda, O.; Varela, D.; Eguiguren, A.L.; Olivero, P.; Stutzin, A. Hydrogen peroxide removes TRPM4 current desensitization conferring increased vulnerability to necrotic cell death. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 37150–37158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ding, X.Q.; Ban, T.; Liu, Z.Y.; Lou, J.; Tang, L.L.; Wang, J.X.; Chu, W.F.; Zhao, D.; Song, B.L.; Zhang, Z.R. Transient Receptor Potential Melastatin 4 (TRPM4) Contributes to High Salt Diet-Mediated Early-Stage Endothelial Injury. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *41*, 835–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Fantozzi, I.; Zhang, S.; Platoshyn, O.; Remillard, C.V.; Cowling, R.T.; Yuan, J.X. Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **2003**, *285*, L1233–L1245. [[CrossRef](#)]
45. Mathar, I.; Vennekens, R.; Meissner, M.; Kees, F.; Van der Mieren, G.; Camacho Londoño, J.E.; Uhl, S.; Voets, T.; Hummel, B.; van den Bergh, A.; et al. Increased catecholamine secretion contributes to hypertension in TRPM4-deficient mice. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 3267–3279. [[CrossRef](#)]
46. Becerra, A.; Echeverría, C.; Varela, D.; Sarmiento, D.; Armisen, R.; Nuñez-Villena, F.; Montecinos, M.; Simon, F. Transient receptor potential melastatin 4 inhibition prevents lipopolysaccharide-induced endothelial cell death. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *91*, 677–684. [[CrossRef](#)]
47. Gerzanich, V.; Kwon, M.S.; Woo, S.K.; Ivanov, A.; Simard, J.M. SUR1-TRPM4 channel activation and phasic secretion of MMP-9 induced by tPA in brain endothelial cells. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195526. [[CrossRef](#)]
48. Meerman, M.; Driessen, R.; van Engeland, N.C.A.; Bergsma, I.; Steenhuijsen, J.L.G.; Kozono, D.; Aikawa, E.; Hjortnaes, J.; Bouten, C.V.C. Radiation Induces Valvular Interstitial Cell Calcific Response in an in vitro Model of Calcific Aortic Valve Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, 687885. [[CrossRef](#)]
49. Nadlonek, N.A.; Weyant, M.J.; Yu, J.A.; Cleveland, J.C., Jr.; Reece, T.B.; Meng, X.; Fullerton, D.A. Radiation induces osteogenesis in human aortic valve interstitial cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2012**, *144*, 1466–1470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Grand, T.; Demion, M.; Norez, C.; Mettey, Y.; Launay, P.; Becq, F.; Bois, P.; Guinamard, R. 9-phenanthrol inhibits human TRPM4 but not TRPM5 cationic channels. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 1697–1705. [[CrossRef](#)]
51. Fernández, B.; Soto-Navarrete, M.T.; López-García, A.; López-Unzu, M.Á.; Durán, A.C.; Fernández, M.C. Bicuspid Aortic Valve in 2 Model Species and Review of the Literature. *Vet. Pathol.* **2020**, *57*, 321–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Biben, C.; Weber, R.; Kesteven, S.; Stanley, E.; McDonald, L.; Elliott, D.A.; Barnett, L.; Köentgen, F.; Robb, L.; Feneley, M.; et al. Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2-5. *Circ. Res.* **2000**, *87*, 888–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Mitra, A.K.; Singh, R.K.; Krishna, M. MAP kinases: Differential activation following in vivo and ex vivo irradiation. *Mol. Cell. Biochem.* **2007**, *294*, 65–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Stewart, B.F.; Siscovick, D.; Lind, B.K.; Gardin, J.M.; Gottdiener, J.S.; Smith, V.E.; Kitzman, D.W.; Otto, C.M. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1997**, *29*, 630–634. [[CrossRef](#)]
55. Csipő, T.; Czíkora, Á.; Fülöp, G.Á.; Gulyás, H.; Rutkai, I.; Tóth, E.P.; Pórszász, R.; Szalai, A.; Bölcskei, K.; Helyes, Z.; et al. A Central Role for TRPM4 in Ca²⁺-Signal Amplification and Vasoconstriction. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Vandewiele, F.; Pironet, A.; Jacobs, G.; Kecskés, M.; Wegener, J.; Kerselaers, S.; Hendrikx, L.; Verelst, J.; Philippaert, K.; Oosterlinck, W.; et al. TRPM4 inhibition by meclofenamate suppresses Ca²⁺-dependent triggered arrhythmias. *Eur. Heart J.* **2022**, ehac354. [[CrossRef](#)]

B. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

1. Caractérisation du canal TRPM4 dans les VICs

Afin de déterminer les mécanismes impliqués dans la SA radio-induite dépendante de TRPM4, nous avons voulu déterminer les types cellulaires valvulaires qui expriment le canal. Nous nous sommes alors intéressés aux VICs qui sont un des deux principaux types cellulaires de la valve aortique.

Nous avons réalisé des mesures électrophysiologiques sur des VICs humaines en culture afin de détecter une éventuelle expression fonctionnelle du canal TRPM4. Les VICs humaines ont été obtenues grâce à la collaboration avec l'UMR S 1096 ENVI de l'Université de Rouen qui nous a fourni ces cellules. Les cellules ont été isolées par dissociation enzymatique de feuillets des valves aortiques issues de chirurgies cardiaques dans le cadre d'un remplacement valvulaire. Des ampoules contenant des cellules isolées nous sont parvenues et ces dernières ont été mise en culture au laboratoire en vue des mesures électrophysiologiques (Figure IV-1).



I.

Figure IV-1 : Micrographie des VICs humaines en culture.

Sur la partie gauche de la photo, Nous pouvons voir une pipette de patch-clamp et les cellules interstitielles valvulaires (VICs). La technique du patch-clamp dans la configuration *inside-out* a été utilisée pour rechercher une signature électrophysiologique du canal TRPM4.

a) Sélectivité ionique du canal

Les mesures électrophysiologiques ont été faites dans la configuration *inside-out* de la technique de patch-clamp. Les mesures de courant ont tout d'abord été effectuées dans les conditions symétriques, avec la solution contenant 145 mM de NaCl de part et d'autre de la membrane. Des sauts de courant traduisant la présence de canaux fonctionnels sont apparus sur les enregistrements. Et différents potentiels ont été imposés afin de réaliser une courbe courant/tension, comme le montre la Figure IV-2.

La conductance du canal unitaire observée, déterminée d'après la pente de la courbe courant/tension est de $20,3 \pm 0,3$ pS ($n = 25$). Afin d'estimer la sélectivité ionique du canal, des enregistrements ont été réalisés avec une solution de 42 mM de NaCl sur la face interne de la membrane ($n = 3$). Dans ces conditions, le point d'inversion de la courbe courant/tension se décale vers le potentiel d'équilibre du sodium, montrant une sélectivité cationique du canal.

Enfin, la solution sur la face interne de la membrane a été remplacée par une solution contenant 145 mM de KCl (Figure IV-2). Dans ces conditions, le point d'inversion de la courbe courant/tension était de 0 mV, indiquant que le canal ne différencie pas le sodium du potassium et qu'il est donc cationique non-sélectif.

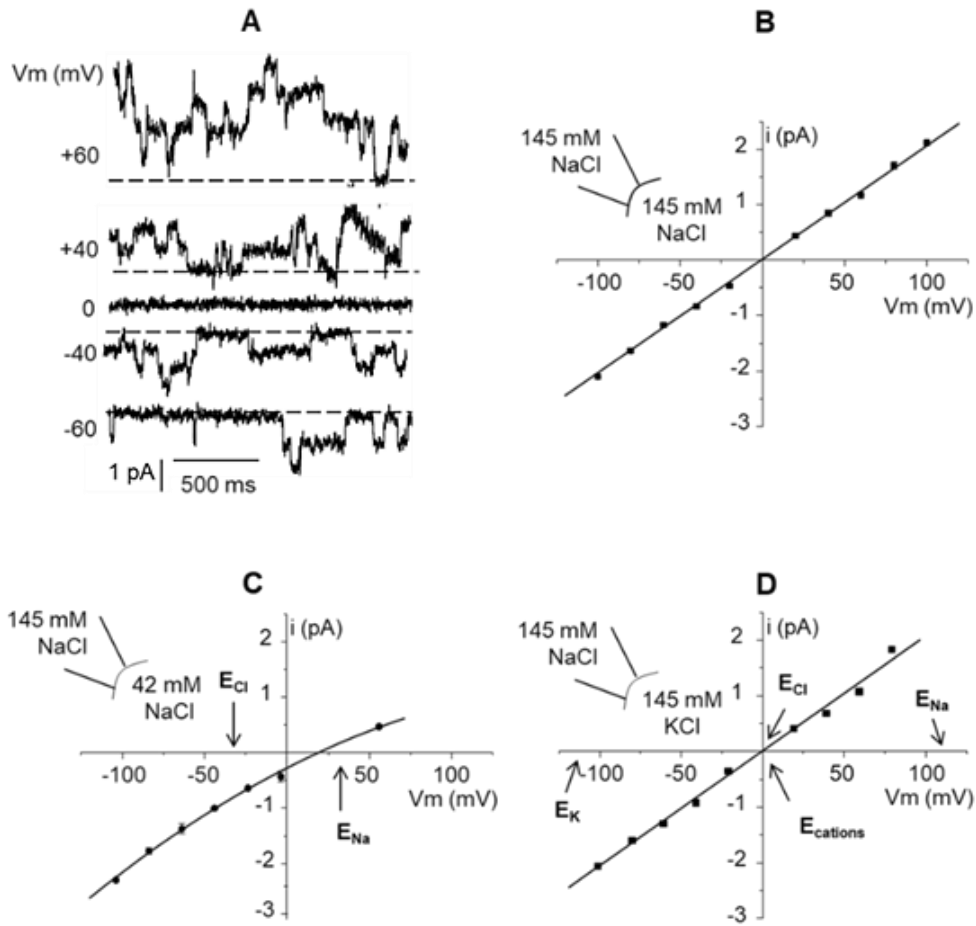


Figure IV-2 : Un courant cationique non-sélectif sur les VICs humaines en culture.

Enregistrement d'un courant dans la configuration *inside-out* sur des VICs humaines en culture. **A** : traces de courant d'un même patch de membrane enregistrées à différents potentiels imposés (V_m). La pipette et le bain contiennent la solution de 145 mM de NaCl avec 1 mM de CaCl_2 (voir méthodes). **B** : courbe courant/tension correspondant aux conditions décrites en A. **C** : courbe courant/tension lorsque la solution de bain contient 42 mM de NaCl. Les potentiels d'inversion des ions Na^+ et Cl^- sont indiqués par E_{Na} et E_{Cl} . **D** : courbe courant/tension lorsque la solution de bain contient 145 mM de KCl. Les potentiels d'inversion des ions Na^+ , K^+ , cations monovalents ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) et Cl^- sont indiqués par E_{Na} , E_{K} , E_{cation} et E_{Cl} .

b) Régulation

La probabilité d'ouverture du canal a été calculée dans la condition symétrique (145 mM NaCl de part et d'autre de la membrane) pour chaque potentiel imposé. Il apparaît que cette probabilité d'ouverture est plus importante dans les potentiels positifs que dans les potentiels négatifs ($n = 11$) (Figure IV-3).

La dépendance du canal au calcium a été évaluée en exposant la face interne de la membrane à des concentrations variables de calcium (10^{-3} , 10^{-7} ou 10^{-9} M) dans la solution de

145 mM NaCl. Les résultats montrent que la probabilité d'ouverture du canal mesurée à +40 mV est dépendante de la concentration en calcium. Par conséquent, l'activité du canal augmente avec la concentration du calcium (Figure IV-3).

Ainsi les enregistrements montrent que les VICs humaines expriment de façon fonctionnelle un canal cationique non-sélectif d'environ 20 pS activé par le calcium interne et la dépolarisation de la membrane cellulaire. Ces caractéristiques correspondent à celles du canal TRPM4 [236].

Des travaux complémentaires menés sur les VICs humaines ont montré la sensibilité du canal au 9-phénanthrol, ce qui confirme son identité TRPM4 (voir le poster Aize et collaborateurs).

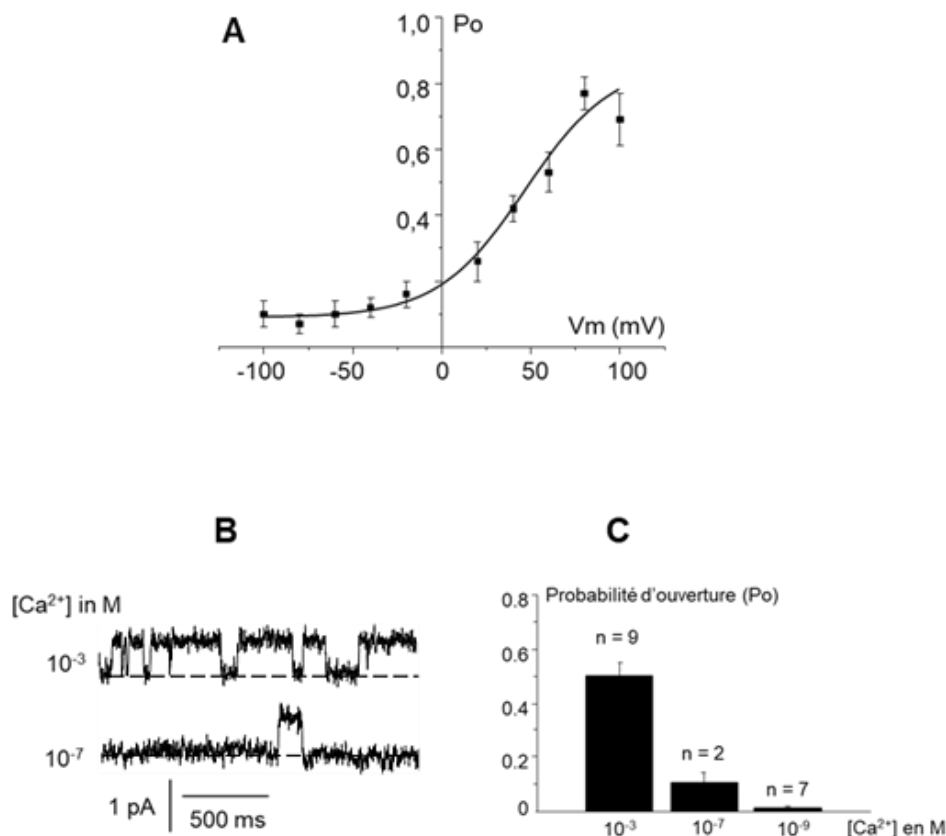


Figure IV-3 : Un courant sensible au voltage et au calcium intracellulaire

A : Probabilité d'ouverture du courant enregistré dans la configuration *inside-out* sur des VICs humaines en culture, en fonction du potentiel imposé (V_m). La pipette et le bain contiennent la solution de 145 mM de NaCl avec 1 mM de CaCl₂ (voir méthodes). **B** : Traces de courant du même patch de membrane enregistrées avec la solution de 145 mM de NaCl de part et d'autre de la membrane. La solution de bain contient 10⁻³ ou 10⁻⁷ M de CaCl₂ (V_m = 40 mV). **C** : Probabilité d'ouverture du canal en fonction de la concentration de CaCl₂ sur la face interne.

2. Implication du canal TRPM4 dans la SA dégénérative

Comme évoqué précédemment, l'âge est l'un des facteurs de risque de la SA. Nous avons donc exploré l'implication du canal TRPM4 dans la mise en place de la SA dégénérative. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris de *Trpm4*^{+/+} et *Trpm4*^{-/-} âgées de 12 mois

Nous avons mesuré les paramètres fonctionnels de la valve aortique et d'autres paramètres cardiaques par échocardiographie. Les vitesses et les gradients de pression ont été mesurés en mode Doppler. Alors que les caractéristiques du ventricule gauche, de l'oreillette gauche et de l'aorte ont été mesurées en mode M comme précédemment décrit.

Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les souris *Trpm4*^{+/+} et *Trpm4*^{-/-} pour les paramètres fonctionnels de la valve aortique : les vitesses transvalvulaires maximale et moyenne de même que pour les gradients de pression transvalvulaires maximal et moyen (Tableau 7). Nous pouvons tout de même noter une tendance à des valeurs plus élevées pour les souris *Trpm4*^{+/+}.

Paramètres	<i>Trpm4</i> ^{+/+} (n=10)	<i>Trpm4</i> ^{-/-} (n=10)	Valeur de p
Vmax (cm/s)	225,8 ± 12,28	199,86 ± 8,04	Ns
ΔPmax (mmHg)	20,9 ± 2,35	16,14 ± 1,30	Ns
Vmoy (cm/s)	135 ± 10,46	119,14 ± 4,75	Ns
ΔPmoy (mmHg)	10,1 ± 1,61	7,71 ± 0,68	Ns

Tableau 7 : Paramètres fonctionnels de la valve aortique des souris âgées de 12 mois

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard. Vmax : vitesse transvalvulaire maximale, Vmoy : vitesse transvalvulaire moyenne, ΔPmax : gradient transvalvulaire maximal, ΔPmoy : gradient transvalvulaire moyen. ns : non significatif.

Les données obtenues sur le ventricule gauche, l'oreillette gauche et l'aorte montrent que les différents paramètres ne sont pas significativement différents entre les animaux *Trpm4*^{+/+} et *Trpm4*^{-/-} ; à l'exception de la fraction de raccourcissement (FR) et la paroi postérieure du ventricule gauche télédiastolique (PPVGd). Ces deux paramètres sont significativement différents entre les deux groupes. Nous avons observé une FR de 36,49 ±

1,13% pour les animaux *Trpm4*^{-/-} contre une FR de 31,08 ± 1,41% pour les souris *Trpm4*^{+/+}. En outre, les souris *Trpm4*^{-/-} (1,09 ± 0,04mm) présentaient une PPVGd significativement plus importante que les souris *Trpm4*^{+/+} (0,94 ± 0,02 mm) (Tableau 8).

Paramètres	<i>Trpm4</i> ^{+/+} (N=10)	<i>Trpm4</i> ^{-/-} (N=10)	Valeur de p
Poids	33,48 ± 1,06	35,79 ± 1,65	Ns
FC (bpm)	361 ± 54,4	444 ± 16,1	Ns
FR (%)	31,08 ± 1,41	36,49 ± 1,13	*
SIVd (mm)	0,82 ± 0,03	0,84 ± 0,05	Ns
SVIs (mm)	1,30 ± 0,04	1,43 ± 0,07	Ns
DIVGd (mm)	4,26 ± 0,09	3,8 ± 0,37	Ns
DIVGs (mm)	2,91 ± 0,11	2,59 ± 0,11	Ns
PPVGd (mm)	0,94 ± 0,02	1,09 ± 0,04	*
PPVGS (mm)	1,25 ± 0,05	1,39 ± 0,06	Ns
Aorte (mm)	1,9 ± 0,04	1,82 ± 0,03	Ns
OG (mm)	1,87 ± 0,05	1,84 ± 0,04	Ns

Tableau 8 : Paramètres cardiaques de souris âgées de 12 mois.

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard. FC : fréquence cardiaque, FR : fraction de raccourcissement, SIV : Septum interventriculaire (d : télédiastolique et s : télésystolique), DIVG : diamètre intraventriculaire du ventricule gauche, PPVG : paroi postérieure du ventricule gauche. Aorte : diamètre de l'aorte. OG : diamètre de l'oreillette gauche, ns : non significatif, * : significatif avec $p < 0,05$.

3. Mesure de la surface de la valve aortique en IRM

En plus d'évaluer la fonction ventriculaire en IRM, nous avons aussi voulu évaluer la fonction et la structure de la valve aortique en IRM. Nous avons commencé par la mise au point de la technique pour mesurer le flux transvalvulaire ainsi que l'aire de la valve aortique.

Pour ce faire, nous avons utilisé une séquence multi coupe « *Cine FLASH black-blood* » en petit axe et une séquence « *localizer* » en grand axe pour visualiser la valve aortique. Les images obtenues lors de la mise au point sont présentées ci-dessous (Figure IV-4).



Figure IV-4 : Visualisation de la valve aortique des souris en IRM

En haut à gauche, vue petit axe du cœur et à droite la vue en grand axe. En bas, zoom sur les images correspondant en haut. Valve aortique encerclée en rouge.

DISCUSSION

V. DISCUSSION

Dans cette étude nous avons évalué l'implication du canal cationique non sélectif TRPM4 dans la sténose aortique radio-induite. Et nos résultats ont démontré que l'irradiation spécifique de la valve aortique de souris induit une diminution de la surface fonctionnelle de la valve ainsi qu'un épaissement des feuillets valvulaires. Ce qui entraîne un remodelage fonctionnel de la valve. La suppression du gène *Trmp4* prévient ce remodelage indiquant ainsi la participation du canal TRPM4 dans le remodelage consécutif à l'irradiation.

Au cours de ce travail nous avons étudié le mécanisme en lien avec la SA radio-induite alors que la majorité d'études évaluent la SA induite par d'autres facteurs de risque. En effet, la plupart d'études utilisent des modèles animaux de SA induite par un régime alimentaire riche en lipide notamment le cholestérol ou des animaux transgéniques soit pour les gènes du métabolisme lipidique comme le récepteur des lipoprotéines de basse densité (*Ldlr*^{-/-}) et les souris déficientes en apolipoprotéine E (*ApoE*^{-/-}), soit les gènes du développement de la valve [308]. Par ailleurs, ces deux approches sont souvent combinées ; à savoir : un modèle transgénique et un régime spécial. Compte tenu de ce qui précède, nous avons combiné deux modèles animaux disponibles au laboratoire. D'une part, un modèle de souris transgénique *Trpm4*^{-/-} [304] qui est bien décrit dans la littérature et a fait l'objet de plusieurs publications notamment celles du laboratoire [272], [278], [278], [279], [281]. D'autre part, un nouveau modèle de SA radio-induite développé au sein du laboratoire. En partant de l'observation que la radiothérapie thoracique entraîne dans certains cas une SA chez l'Homme, nous avons développé ce modèle qui développe des caractéristiques de la SA après irradiation de la valve. La particularité de notre modèle est que nous avons précisément ciblé la valve aortique pour s'affranchir des effets de l'irradiation sur les autres structures cardiaques. Cette approche diffère de celle des autres études chez la souris dans lesquelles soit le cœur entier ou l'animal était irradié [314], [315], soit une partie du cœur tel que l'apex [316]. De plus, une revue de la littérature a montré que, sur 159 études utilisant des modèles de remodelage cardiaque radio-induit chez les rongeurs, seulement 4% concernent l'irradiation d'une zone restreinte du cœur. Alors que, les autres utilisaient l'irradiation du cœur entier ou de tout l'animal [317].

En se basant sur les données de la littérature, différentes doses, dont certaines fractionnées, ont été testées au laboratoire [310]. La dose de 10 Gy a été retenue parce qu'elle entraîne des dommages valvulaires. Les effets observés n'étaient pas plus importants avec les

doses supérieures ou avec un fractionnement de la dose. Nous avons fait le choix de ne pas fractionner la dose pour le bien-être de nos animaux parce que l'irradiation des souris est une procédure qui peut durer longtemps. En effet, soumettre les animaux plus d'une fois à des durées aussi longues d'anesthésie peut avoir des conséquences sur leur bien-être. Bien que cela nous éloigne des conditions de radiothérapie utilisées en clinique où la dose reçue par les patients est fractionnée en plusieurs fois au cours du temps. De plus, la majorité des études sur les modèles animaux utilisent une seule dose (85%) [317]. En ce qui concerne la dose de 10 Gy que nous avons utilisée dans cette étude, elle pourrait sembler élevée sachant que nous ciblons spécifiquement la valve aortique. Pourtant, elle reste inférieure à la dose moyenne de 16 Gy utilisée dans les études *in vivo* chez l'animal pour évaluer la cardiotoxicité des rayonnements ionisants [317].

Dans une récente étude, Donis et collaborateurs ont regardé l'effet combiné d'un régime riche en cholestérol et de l'irradiation. Ils n'ont observé aucun effet de l'irradiation à 8 semaines après irradiation sur l'aorte et les valves aortique et mitrale de lapin. Cependant, l'irradiation a potentialisé les effets du régime riche en cholestérol. En effet, ils ont observé un épaissement et une infiltration des cellules immunitaires plus importants ainsi que plus de calcification de la valve aortique dans le groupe irradié [309]. Dans notre cas, nous avons observé un remodelage morphologique et fonctionnel de la valve aortique 5 mois après l'irradiation. Ce délai peut paraître court comparé au temps de latence qui est de 10 à 20 ans avant l'apparition des signes de la pathologie chez l'homme [318]. Toutefois, rapporté à l'espérance de vie d'une souris cette durée rentre dans cet intervalle de temps.

Certaines études sur les effets cardiaques de l'irradiation chez la souris ont révélé une augmentation de la fibrose ventriculaire détectée 5 mois après l'irradiation spécifique du cœur [314], [316]. La même observation a été également faite chez le rat [319]. Dans notre cas, nous n'avons pas observé de fibrose au niveau des ventricules ni au niveau des oreillettes alors qu'elle était présente dans les feuillets valvulaires. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nous avons spécifiquement visé la valve aortique. Bien que les faisceaux ionisants aient pu traverser ces structures pour atteindre la valve, nous n'avons pas observé de remodelage ventriculaire ou atrial peut-être parce que la surface impliquée était minime. Ces résultats étayent l'idée que nous avons bien ciblé la valve aortique. Nous avons également observé une hypertrophie du ventricule gauche avec une fraction d'éjection conservée chez les souris *Trpm4^{-/-}* comparées aux animaux *Trpm4^{+/+}* en IRM. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus

en échographie chez la même souche de souris [272], [279]. Nous n'avons pas observé d'atteinte ventriculaire secondaire à la SA. Un tel remodelage ventriculaire en réponse au rétrécissement de la valve se développerait peut-être à plus long terme.

La SA se manifeste tardivement par une calcification des feuillets valvulaires, cependant nous n'avons pas observé de dépôt de calcium sur les feuillets ni avec la coloration au rouge Alizarine et ni avec celle au Von Kossa. Ces résultats peuvent s'expliquer par la durée du suivi qui est de 5 mois. Ces résultats montrent que le processus de calcification connu pour intervenir dans la phase finale de la pathologie n'a pas pu se mettre en place. En outre, la fibrose est le premier signe détectable de la SA radio-induite chez l'homme. Elle débute 4 à 12 mois après la radiothérapie, puis progresse avec les années [320]. Notre étude représenterait alors l'étape initiale du remodelage valvulaire.

Néanmoins, une étude a démontré que l'irradiation inhibe la maturation et la minéralisation des ostéoblastes MC3T3-E1 en culture [321]. Les auteurs ont observé la diminution des marqueurs ostéogéniques (Runx2, ostéopontine, ostéocalcine, ostéorix, la sialoprotéine osseuse) et de l'activité de l'ALP. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un type cellulaire valvulaire, ces résultats pourraient expliquer la mise en place tardive de la calcification et éventuellement son absence dans certains cas de SA radio-induite en comparaison aux SA d'autres origines. A l'inverse, des études *in vitro* sur les cellules interstitielles valvulaires démontrent que l'irradiation entraîne la calcification et l'expression des marqueurs ostéogéniques [213], [214].

Dans ce travail nous avons montré que l'irradiation entraîne une fibrose ainsi qu'une sténose de la valve aortique et que le canal TRPM4 participe à ce processus. Cependant, les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans ce remodelage valvulaire restent à identifier. L'une des pistes est que le canal TRPM4 soit impliqué via son expression par les cellules endothéliales valvulaires. En effet, la SA débute avec une lésion endothéliale et le canal TRPM4 est exprimé par différentes cellules endothéliales telles que les cellules des artères pulmonaires humaines, les cellules endothéliales aortiques de souris et les cellules endothéliales cérébrales humaines et de souris [254], [307], [322]. Toutefois, son expression dans les VECs n'a pas encore été démontrée. Des études ont démontré que le canal TRPM4 participe à la lésion endothéliale [253], [299], [323] ; notamment celle induite par le LPS. Un mécanisme similaire à celui observé lors de la SA [299]. Cette lésion est liée aux espèces réactives de l'oxygène. Nous savons que le canal TRPM4 est impliqué dans les lésions induites par les ROS. De plus,

les ROS entraînent une surexpression du canal TRPM4 dans les HUVECs (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cell*) après un traitement avec le H₂O₂ [253]. En plus des cellules endothéliales, le canal TRPM4 participe également aux effets néfastes induits par les ROS sur les cardiomyocytes [296]. Ce canal participe aussi à la sécrétion du MMP-9 par les cellules endothéliales cérébrales murines et humaines [254] ainsi qu'à la transition épithélio-mésenchymateuse (similaire à la transition endothélio-mésenchymateuse) des cellules cancéreuses de la prostate [324]. Ces processus sont également observés dans la SA.

L'autre piste serait que les cellules interstitielles, l'un des acteurs principaux de la physiopathologie de la SA, soient le lien entre le canal TRPM4 et le remodelage observé. En effet, les VICs expriment le canal TRPM4 [271] comme nous l'avons confirmé dans ce travail en enregistrant son activité fonctionnelle. En outre, le canal TRPM4 est exprimé dans les fibroblastes qui sont un type cellulaire auquel appartient les VICs. Comme évoqué précédemment, le canal TRPM4 est impliqué dans la transition des fibroblastes atriaux en myofibroblastes. En culture, cette transition est diminuée chez les fibroblastes de souris *Trpm4*^{-/-} par rapport à ceux issus d'animaux *Trpm4*^{+/+} [281]. Ce mécanisme est également présent et crucial au développement de la SA. Les VICs s'activent en VICs myofibroblastiques responsables de la synthèse accrue de la MEC et de la fibrose qui en découle. De plus, une récente étude a démontré que la suppression du gène *Trpm4*, spécifiquement dans les cardiomyocytes, entraîne une réduction de la fibrose du ventricule induite par la surcharge de pression chez la souris [292] [16]. Ce qui indique que le canal TRPM4 participe également à la fibrose cardiaque par le biais de ces cellules. La voie de signalisation du TGF- β est connue pour participer à la différenciation des VICs quiescentes en VICs myofibroblastiques [117]. De plus, une augmentation de la signalisation TGF- β 1 se produit des semaines après la radiothérapie [325]. Cette voie pourrait médier la différenciation via TRPM4. En effet, l'expression du canal TRPM4 augmente dans les fibroblastes ventriculaires humains en culture après incubation avec le TGF- β [326].

L'une des limites de cette étude est que nous avons utilisé que des souris mâles. Nous avons fait ce choix parce que le genre masculin est plus sujet à la SA avec un risque deux fois plus élevé que le genre féminin [327]. Une autre limite est la durée du suivi qui est courte pour visualiser le stade avancé de la pathologie. Cependant, l'un des points forts de notre étude est que nous avons évalué l'effet *in vivo* de l'irradiation de la valve au lieu d'une étude *in vitro*. Elle permet ainsi une meilleure appréciation des effets à long terme observés chez les patients traités

par radiothérapie. Par ailleurs, Il a été démontré que les effets de l'irradiation *in vivo* sont plus importants que ceux observés *in vitro* en culture cellulaire [328].

Par la technique de patch-clamp nous avons montré que les VICs humaines expriment le canal TRM4 et qu'il est fonctionnel. Les caractéristiques du courant observées en canal unitaire sont bien celles du canal TRPM4 ; à savoir : un canal cationique non-sélectif d'environ 20 pS de conductance, activé par le calcium interne et la dépolarisation cellulaire. Même si nous n'avons pas montré l'expression protéique du canal dans les VICs, une autre étude a démontré par western blot l'expression protéique du canal TRPM4 dans les VICs humaines [271]. Ces résultats nous permettent de suspecter la participation du canal dans le remodelage valvulaire via son expression dans les VICs.

Nous avons également évalué l'implication du canal TRPM4 dans la SA liée au vieillissement puisque cette maladie est connue pour atteindre principalement les personnes âgées. La prévalence de la pathologie augmentant avec l'âge [58]. Pour répondre à cette question, nous avons mesuré les paramètres fonctionnels valvulaires chez les souris sauvages et TRPM4 *knock-out* âgées de 12 mois. Nous n'avons pas observé de différence de la fonction valvulaire entre les groupes de souris *Trpm4^{+/+}* et *Trpm4^{-/-}*. Ces résultats peuvent être expliqués d'une part par l'âge de nos souris. Bien qu'elles aient 12 mois, rapporté à l'Homme, cela reste inférieur à l'âge moyen de la population la plus à risque. D'autre part par le fait que les souris et les rats, ne développent pas spontanément de SA [308].

Comme évoqué précédemment, l'IRM est un outil complémentaire dans le diagnostic de la SA. Nous avons voulu visualiser et mesurer l'aire de la valve aortique de souris en IRM. Après différentes mises au point, nous avons pu visualiser la valve aortique en IRM. Malheureusement, nous n'avons pas pu optimiser et standardiser notre protocole pour effectuer facilement les mesures sur la valve aortique de souris. Même si cette technique est couramment utilisée en clinique, à notre connaissance, une seule étude a effectué pareille mesure chez la souris [329].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail nous avons mis en évidence l'implication du canal TRM4 dans le remodelage de la valve aortique radio-induit. En effet, nous avons montré que les souris *Trpm4^{+/+}* présentent un épaissement et une fibrose du feuillet valvulaire plus importante après l'irradiation de la valve aortique. A cela s'ajoute une augmentation de la vélocité maximale et du gradient de pression moyen qui traduit un rétrécissement de la valve aortique. Ces animaux développent donc des signes pathologiques de la sténose aortique. En revanche, en l'absence du canal, chez les souris *Trpm4^{-/-}*, l'irradiation ne semble avoir aucun effet sur le remodelage de la valve. En outre, ce travail a démontré que le canal TRPM4 est bien présent et fonctionnel dans les cellules interstitielles valvulaires. En effet, nous avons observé un canal cationique non sélectif sensible au calcium et dépendant du voltage en patch-clamp. Ce sont les caractéristiques du canal TRPM4. Cependant, plusieurs questions restent en suspens, notamment l'identification du ou des types cellulaires valvulaires qui médient l'effet du canal TRPM4 ainsi que les voies de signalisation de ces processus où l'irradiation module le canal TRPM4 et ce dernier participe à la fibrose.

Dans un premier temps, il serait intéressant de compléter les résultats obtenus en explorant les autres processus de la SA entre autres l'inflammation et le dépôt de lipides. La réaction inflammatoire est une composante importante de la physiopathologie de la SA et nous savons que le canal TRPM4 participe à la modulation de la réponse immunitaire. Nous pouvons évaluer cette dernière par un marquage immunohistochimique des cellules immunitaires. Par exemples utiliser les anticorps (anti-RAM-11 et anti-CD3) pour marquer respectivement les macrophages et les lymphocytes infiltrants. L'autre marqueur de l'inflammation est l'activation de l'endothélium. En effet, les cellules endothéliales expriment plus de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 au cours de la réaction inflammatoire. Ces molécules facilitent le recrutement des cellules immunitaires et leurs infiltrations des tissus. Nous pourrions donc évaluer cette activation *in vivo* en IRM en utilisant les microparticules d'oxide de fer couplées à un anticorps (anti-VCAM-1) comme produit de contraste. Par ailleurs, nous pourrions également quantifier le dépôt de lipides par un marquage au Oil red O ou des anticorps contre les LDL/oxLDL et d'autres lipides.

Il serait aussi intéressant d'évaluer l'expression du canal TRPM4 ainsi que son activité dans les VECs, comme nous l'avons fait pour les VICs, pour savoir si ces cellules pourraient être responsables des différences dans le développement de la SA que nous avons observé entre les souris *Trpm4*^{+/+} et *Trpm4*^{-/-}

En outre, nous pourrions également évaluer l'expression protéique totale des valves des souris *Trpm4*^{+/+} et *Trpm4*^{-/-} après irradiation. Par conséquent, il serait intéressant de cibler par western blot les protéines dont l'expression est connue pour changer au cours de la pathologie telles que les MMPs ou l' α -SMA.

Dans le but d'identifier clairement le type cellulaire répondant initialement à l'irradiation dans une approche *in vitro*, nous pourrions irradier les VICs ou les VECs en culture et regarder la variation de l'expression du canal TRPM4 dans ces cellules. De même, nous pourrions regarder l'expression des marqueurs de différenciation myofibroblastique et de la fibrose dans ces cellules en présence ou en absence du canal ; notamment en utilisant les inhibiteurs pharmacologiques du canal (9-phénantrol) ou en inhibant son expression (siRNA ou shRNA).

Il serait pertinent d'inclure les souris femelles dans notre protocole. En effet, comme évoqué dans la partie sur les facteurs de risques, les femmes et les hommes présentent des différences physiopathologiques dans la SA. Il serait également intéressant de tester le fractionnement de la dose pour se rapprocher de ce qui se passe chez l'homme lors de la radiothérapie. Enfin, il serait pertinent de suivre les animaux plus longtemps pour éventuellement observer la calcification qui représente la phase tardive de la maladie.

D'un point de vue méthodologique, nos résultats préliminaires ont montré qu'il était possible d'évaluer l'aire de la valve aortique et le flux sanguin transvalvulaire en IRM. Toutefois une amélioration des protocoles est nécessaire pour des mesures en routine.

BIBLIOGRAPHIE

VII. BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. Basu et V. Garg, « Maternal hyperglycemia and fetal cardiac development: Clinical impact and underlying mechanisms », *Birth Defects Res.*, vol. 110, n° 20, p. 1504-1516, 2018, doi: 10.1002/bdr2.1435.
- [2] C. M. Otto, J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, A. M. Gown, et K. D. O'Brien, « Characterization of the early lesion of “degenerative” valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. », *Circulation*, vol. 90, n° 2, p. 844-853, août 1994, doi: 10.1161/01.CIR.90.2.844.
- [3] E. I. Charitos et H.-H. Sievers, « Anatomy of the aortic root: implications for valve-sparing surgery », *Ann. Cardiothorac. Surg.*, vol. 2, n° 1, p. 53-56, janv. 2013, doi: 10.3978/j.issn.2225-319X.2012.11.18.
- [4] R. B. Hinton et K. E. Yutzey, « Heart valve structure and function in development and disease », *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 73, p. 29-46, 2011, doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142145.
- [5] R. B. Hinton *et al.*, « Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves », *Circ. Res.*, vol. 98, n° 11, p. 1431-1438, juin 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000224114.65109.4e.
- [6] M. S. Sacks, W. David Merryman, et D. E. Schmidt, « On the biomechanics of heart valve function », *J. Biomech.*, vol. 42, n° 12, p. 1804-1824, août 2009, doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.05.015.
- [7] J.-H. Chen et C. A. Simmons, « Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues », *Circ. Res.*, vol. 108, n° 12, p. 1510-1524, juin 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234237.
- [8] F. J. Schoen, « Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering », *Circulation*, vol. 118, n° 18, p. 1864-1880, oct. 2008, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.805911.
- [9] N. M. Rajamannan *et al.*, « Calcific Aortic Valve Disease: Not Simply a Degenerative Process: A Review and Agenda for Research From the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group *Executive Summary: Calcific Aortic Valve Disease – 2011 Update* », *Circulation*, vol. 124, n° 16, p. 1783-1791, oct. 2011, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.006767.
- [10] R. R. Markwald, T. P. Fitzharris, et F. J. Manasek, « Structural development of endocardial cushions », *Am. J. Anat.*, vol. 148, n° 1, p. 85-119, janv. 1977, doi: 10.1002/aja.1001480108.
- [11] M. D. Combs et K. E. Yutzey, « Heart valve development: regulatory networks in development and disease », *Circ. Res.*, vol. 105, n° 5, p. 408-421, août 2009, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201566.
- [12] S. LaHaye, J. Lincoln, et V. Garg, « Genetics of Valvular Heart Disease », *Curr. Cardiol. Rep.*, vol. 16, n° 6, p. 487, avr. 2014, doi: 10.1007/s11886-014-0487-2.

- [13] Y. Wang, Y. Fang, P. Lu, B. Wu, et B. Zhou, « NOTCH Signaling in Aortic Valve Development and Calcific Aortic Valve Disease », *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 8, 2021, Consulté le: 6 avril 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcvm.2021.682298>
- [14] A. Wessels *et al.*, « Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart », *Dev. Biol.*, vol. 366, n° 2, p. 111-124, juin 2012, doi: 10.1016/j.ydbio.2012.04.020.
- [15] A. C. Gittenberger-de Groot, M. P. Vrancken Peeters, M. M. Mentink, R. G. Gourdie, et R. E. Poelmann, « Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions », *Circ. Res.*, vol. 82, n° 10, p. 1043-1052, juin 1998, doi: 10.1161/01.res.82.10.1043.
- [16] L. E. Briggs *et al.*, « Expression of the BMP receptor Alk3 in the second heart field is essential for development of the dorsal mesenchymal protrusion and atrioventricular septation », *Circ. Res.*, vol. 112, n° 11, p. 1420-1432, mai 2013, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300821.
- [17] J. Lincoln, A. W. Lange, et K. E. Yutzey, « Hearts and bones: shared regulatory mechanisms in heart valve, cartilage, tendon, and bone development », *Dev. Biol.*, vol. 294, n° 2, p. 292-302, juin 2006, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.03.027.
- [18] Y. Nakajima, T. Yamagishi, S. Hokari, et H. Nakamura, « Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP) », *Anat. Rec.*, vol. 258, n° 2, p. 119-127, févr. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(20000201)258:2<119::AID-AR1>3.0.CO;2-U.
- [19] Y. Sugi, H. Yamamura, H. Okagawa, et R. R. Markwald, « Bone morphogenetic protein-2 can mediate myocardial regulation of atrioventricular cushion mesenchymal cell formation in mice », *Dev. Biol.*, vol. 269, n° 2, p. 505-518, mai 2004, doi: 10.1016/j.ydbio.2004.01.045.
- [20] C. M. Alfieri, J. Cheek, S. Chakraborty, et K. E. Yutzey, « Wnt signaling in heart valve development and osteogenic gene induction », *Dev. Biol.*, vol. 338, n° 2, p. 127-135, févr. 2010, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.11.030.
- [21] J. Lincoln, C. M. Alfieri, et K. E. Yutzey, « BMP and FGF regulatory pathways control cell lineage diversification of heart valve precursor cells », *Dev. Biol.*, vol. 292, n° 2, p. 292-302, avr. 2006, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.12.042.
- [22] E. E. Wirrig et K. E. Yutzey, « Conserved transcriptional regulatory mechanisms in aortic valve development and disease », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 34, n° 4, p. 737-741, avr. 2014, doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302071.
- [23] F. J. de Lange *et al.*, « Lineage and Morphogenetic Analysis of the Cardiac Valves », *Circ. Res.*, vol. 95, n° 6, p. 645-654, sept. 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000141429.13560.cb.
- [24] M. Cimini, K. A. Rogers, et D. R. Boughner, « Smoothelin-positive cells in human and porcine semilunar valves », *Histochem. Cell Biol.*, vol. 120, n° 4, p. 307-317, oct. 2003, doi: 10.1007/s00418-003-0570-z.

- [25] H. Wang, B. Sridhar, L. A. Leinwand, et K. S. Anseth, « Characterization of cell subpopulations expressing progenitor cell markers in porcine cardiac valves », *PloS One*, vol. 8, n° 7, p. e69667, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0069667.
- [26] E. Aikawa *et al.*, « Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering », *Circulation*, vol. 113, n° 10, p. 1344-1352, mars 2006, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.591768.
- [27] N. Latif, P. Sarathchandra, P. M. Taylor, J. Antoniow, N. Brand, et M. H. Yacoub, « Characterization of molecules mediating cell-cell communication in human cardiac valve interstitial cells », *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 45, n° 3, p. 255-264, juill. 2006, doi: 10.1385/CBB:45:3:255.
- [28] Y. Huang, K. Xu, T. Zhou, P. Zhu, N. Dong, et J. Shi, « Comparison of Rapidly Proliferating, Multipotent Aortic Valve-Derived Stromal Cells and Valve Interstitial Cells in the Human Aortic Valve », *Stem Cells Int.*, 2019, doi: <https://doi.org/10.1155/2019/7671638>.
- [29] A. C. Liu, V. R. Joag, et A. I. Gotlieb, « The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology », *Am. J. Pathol.*, vol. 171, n° 5, p. 1407-1418, nov. 2007, doi: 10.2353/ajpath.2007.070251.
- [30] R. P. Visconti *et al.*, « An in vivo analysis of hematopoietic stem cell potential: hematopoietic origin of cardiac valve interstitial cells », *Circ. Res.*, vol. 98, n° 5, p. 690-696, mars 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000207384.81818.d4.
- [31] W. D. Merryman *et al.*, « Correlation between heart valve interstitial cell stiffness and transvalvular pressure: implications for collagen biosynthesis », *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, vol. 290, n° 1, p. H224-H231, janv. 2006, doi: 10.1152/ajpheart.00521.2005.
- [32] W. D. Merryman, J. Liao, A. Parekh, J. E. Candiello, H. Lin, et M. S. Sacks, « Differences in Tissue-Remodeling Potential of Aortic and Pulmonary Heart Valve Interstitial Cells », *Tissue Eng.*, vol. 13, n° 9, p. 2281-2289, sept. 2007, doi: 10.1089/ten.2006.0324.
- [33] R. G. Tompkins, J. J. Schnitzer, et M. L. Yarmush, « Macromolecular transport within heart valves. », *Circ. Res.*, vol. 64, n° 6, p. 1213-1223, juin 1989, doi: 10.1161/01.RES.64.6.1213.
- [34] A. M. Müller, C. Cronen, L. I. Kupferwasser, H. Oelert, K.-M. Müller, et C. J. Kirkpatrick, « Expression of endothelial cell adhesion molecules on heart valves: up-regulation in degeneration as well as acute endocarditis », *J. Pathol.*, vol. 191, n° 1, p. 54-60, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200005)191:1<54::AID-PATH568>3.0.CO;2-Y.
- [35] J. T. Butcher et R. M. Nerem, « Valvular Endothelial Cells Regulate the Phenotype of Interstitial Cells in Co-culture: Effects of Steady Shear Stress », *Tissue Eng.*, vol. 12, n° 4, p. 905-915, avr. 2006, doi: 10.1089/ten.2006.12.905.
- [36] K. Bosse *et al.*, « Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 60, p. 27-35, juill. 2013, doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.04.001.
- [37] J. Richards *et al.*, « Side-specific endothelial-dependent regulation of aortic valve calcification: interplay of hemodynamics and nitric oxide signaling », *Am. J. Pathol.*, vol. 182, n° 5, p. 1922-1931, mai 2013, doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.037.

- [38] I. El-Hamamsy *et al.*, « Endothelium-Dependent Regulation of the Mechanical Properties of Aortic Valve Cusps », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 53, n° 16, p. 1448-1455, avr. 2009, doi: 10.1016/j.jacc.2008.11.056.
- [39] C. Y. Y. Yip, M. C. Blaser, Z. Mirzaei, X. Zhong, et C. A. Simmons, « Inhibition of pathological differentiation of valvular interstitial cells by C-type natriuretic peptide », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, n° 8, p. 1881-1889, août 2011, doi: 10.1161/ATVBAHA.111.223974.
- [40] J. T. Butcher, A. M. Penrod, A. J. García, et R. M. Nerem, « Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, n° 8, p. 1429-1434, août 2004, doi: 10.1161/01.ATV.0000130462.50769.5a.
- [41] J. Bischoff et E. Aikawa, « Progenitor cells confer plasticity to cardiac valve endothelium », *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, vol. 4, n° 6, p. 710-719, déc. 2011, doi: 10.1007/s12265-011-9312-0.
- [42] L. Osman *et al.*, « A novel role of the sympatho-adrenergic system in regulating valve calcification », *Circulation*, vol. 116, n° 11 Suppl, p. I282-287, sept. 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.681072.
- [43] E. J. Farrar et J. T. Butcher, « Heterogeneous susceptibility of valve endothelial cells to mesenchymal transformation in response to TNF α », *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 42, n° 1, p. 149-161, janv. 2014, doi: 10.1007/s10439-013-0894-3.
- [44] Driscoll Katherine, Cruz Alexander D., et Butcher Jonathan T., « Inflammatory and Biomechanical Drivers of Endothelial-Interstitial Interactions in Calcific Aortic Valve Disease », *Circ. Res.*, vol. 128, n° 9, p. 1344-1370, avr. 2021, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318011.
- [45] L. J. Anstine, T. E. Horne, E. M. Horwitz, et J. Lincoln, « Contribution of Extra-Cardiac Cells in Murine Heart Valves is Age-Dependent », *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 6, n° 10, p. e007097, 2017, doi: 10.1161/JAHA.117.007097.
- [46] N. Latif, P. Sarathchandra, P. M. Taylor, J. Antoniow, et M. H. Yacoub, « Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves », *J. Heart Valve Dis.*, vol. 14, n° 2, p. 218-227, mars 2005.
- [47] H. Tseng et K. J. Grande-Allen, « Elastic fibers in the aortic valve spongiosa: A fresh perspective on its structure and role in overall tissue function », *Acta Biomater.*, vol. 7, n° 5, p. 2101-2108, mai 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2011.01.022.
- [48] K. J. Grande-Allen, N. Osman, M. L. Ballinger, H. Dadlani, S. Marasco, et P. J. Little, « Glycosaminoglycan synthesis and structure as targets for the prevention of calcific aortic valve disease », *Cardiovasc. Res.*, vol. 76, n° 1, p. 19-28, oct. 2007, doi: 10.1016/j.cardiores.2007.05.014.
- [49] R. A. Norris *et al.*, « Periostin regulates atrioventricular valve maturation », *Dev. Biol.*, vol. 316, n° 2, p. 200-213, avr. 2008, doi: 10.1016/j.ydbio.2008.01.003.
- [50] D. Hakuno *et al.*, « Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents », *J. Clin. Invest.*, vol. 120, n° 7, p. 2292-2306, juill. 2010, doi: 10.1172/JCI40973.

- [51] J. Satta *et al.*, « Progression of human aortic valve stenosis is associated with tenascin-C expression », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 39, n° 1, p. 96-101, janv. 2002, doi: 10.1016/s0735-1097(01)01705-3.
- [52] B. R. Lindman *et al.*, « Calcific aortic stenosis », *Nat. Rev. Dis. Primer*, vol. 2, n° 1, p. 1-28, mars 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.6.
- [53] L. Hanna, C. Armour, X. Y. Xu, et R. Gibbs, « The Haemodynamic and Pathophysiological Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease », *Biomedicines*, vol. 10, n° 6, p. 1317, juin 2022, doi: 10.3390/biomedicines10061317.
- [54] S. H. Goldberg, S. Elmariah, M. A. Miller, et V. Fuster, « Insights into degenerative aortic valve disease », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 50, n° 13, p. 1205-1213, sept. 2007, doi: 10.1016/j.jacc.2007.06.024.
- [55] B. Iung *et al.*, « A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease », *Eur. Heart J.*, vol. 24, n° 13, p. 1231-1243, juill. 2003, doi: 10.1016/S0195-668X(03)00201-X.
- [56] N. M. Rajamannan, B. Gersh, et R. O. Bonow, « Calcific aortic stenosis: from bench to the bedside--emerging clinical and cellular concepts », *Heart Br. Card. Soc.*, vol. 89, n° 7, p. 801-805, juill. 2003, doi: 10.1136/heart.89.7.801.
- [57] V. T. Nkomo, J. M. Gardin, T. N. Skelton, J. S. Gottdiener, C. G. Scott, et M. Enriquez-Sarano, « Burden of valvular heart diseases: a population-based study », *The Lancet*, vol. 368, n° 9540, p. 1005-1011, sept. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69208-8.
- [58] B. Alushi *et al.*, « Calcific Aortic Valve Disease-Natural History and Future Therapeutic Strategies », *Front. Pharmacol.*, vol. 11, p. 685, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00685.
- [59] S. Yadgir *et al.*, « Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017 », *Circulation*, vol. 141, n° 21, p. 1670-1680, mai 2020, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043391.
- [60] B. Iung *et al.*, « Contemporary Presentation and Management of Valvular Heart Disease: The EURObservational Research Programme Valvular Heart Disease II Survey », *Circulation*, vol. 140, n° 14, p. 1156-1169, oct. 2019, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041080.
- [61] C. Ward, « Clinical significance of the bicuspid aortic valve », *Heart Br. Card. Soc.*, vol. 83, n° 1, p. 81-85, janv. 2000, doi: 10.1136/heart.83.1.81.
- [62] M. T. Soto-Navarrete, M. Á. López-Unzu, A. C. Durán, et B. Fernández, « Embryonic development of bicuspid aortic valves », *Prog. Cardiovasc. Dis.*, vol. 63, n° 4, p. 407-418, août 2020, doi: 10.1016/j.pcad.2020.06.008.
- [63] N. Saikrishnan, L. Mirabella, et A. P. Yoganathan, « Bicuspid aortic valves are associated with increased wall and turbulence shear stress levels compared to trileaflet aortic valves », *Biomech. Model. Mechanobiol.*, vol. 14, n° 3, p. 577-588, juin 2015, doi: 10.1007/s10237-014-0623-3.

- [64] P. Mathieu *et al.*, « The pathology and pathobiology of bicuspid aortic valve: State of the art and novel research perspectives », *J. Pathol. Clin. Res.*, vol. 1, n° 4, p. 195-206, 2015, doi: 10.1002/cjp2.21.
- [65] I. Ferreira-González *et al.*, « Prevalence of calcific aortic valve disease in the elderly and associated risk factors: a population-based study in a Mediterranean area », *Eur. J. Prev. Cardiol.*, vol. 20, n° 6, p. 1022-1030, déc. 2013, doi: 10.1177/2047487312451238.
- [66] F. E. C. M. Peeters *et al.*, « Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment », *Eur. Heart J.*, vol. 39, n° 28, p. 2618-2624, juill. 2018, doi: 10.1093/eurheartj/ehx653.
- [67] H.-H. Sievers et C. Schmidtke, « A classification system for the bicuspid aortic valve from 304 surgical specimens », *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 133, n° 5, p. 1226-1233, mai 2007, doi: 10.1016/j.jtcvs.2007.01.039.
- [68] L. A. Timmerman *et al.*, « Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation », *Genes Dev.*, vol. 18, n° 1, p. 99-115, janv. 2004, doi: 10.1101/gad.276304.
- [69] V. Garg *et al.*, « Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease », *Nature*, vol. 437, n° 7056, Art. n° 7056, sept. 2005, doi: 10.1038/nature03940.
- [70] S. A. Mohamed *et al.*, « Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 345, n° 4, p. 1460-1465, juill. 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.046.
- [71] D. Aicher, C. Urbich, A. Zeiher, S. Dimmeler, et H.-J. Schäfers, « Endothelial nitric oxide synthase in bicuspid aortic valve disease », *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 83, n° 4, p. 1290-1294, avr. 2007, doi: 10.1016/j.athoracsur.2006.11.086.
- [72] B. Laforest, G. Andelfinger, et M. Nemer, « Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve », *J. Clin. Invest.*, vol. 121, n° 7, p. 2876-2887, juill. 2011, doi: 10.1172/JCI44555.
- [73] E. E. Wirrig et K. E. Yutzey, « Transcriptional regulation of heart valve development and disease », *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, vol. 20, n° 3, p. 162-167, juin 2011, doi: 10.1016/j.carpath.2010.06.010.
- [74] R. B. Hinton *et al.*, « Elastin haploinsufficiency results in progressive aortic valve malformation and latent valve disease in a mouse model », *Circ. Res.*, vol. 107, n° 4, p. 549-557, août 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.221358.
- [75] R. S. Wong, F. M. Follis, B. K. Shively, et J. A. Wernly, « Osteogenesis imperfecta and cardiovascular diseases », *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 60, n° 5, p. 1439-1443, nov. 1995, doi: 10.1016/0003-4975(95)00706-Q.
- [76] F. Malfait, S. Symoens, P. Coucke, L. Nunes, S. De Almeida, et A. De Paepe, « Total absence of the alpha2(I) chain of collagen type I causes a rare form of Ehlers-Danlos syndrome with hypermobility and propensity to cardiac valvular problems », *J. Med. Genet.*, vol. 43, n° 7, p. e36, juill. 2006, doi: 10.1136/jmg.2005.038224.

- [77] Y. Nie *et al.*, « Palmdelphin promotes myoblast differentiation and muscle regeneration », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, févr. 2017, doi: 10.1038/srep41608.
- [78] S. Thériault *et al.*, « A transcriptome-wide association study identifies PALMD as a susceptibility gene for calcific aortic valve stenosis », *Nat. Commun.*, vol. 9, n° 1, Art. n° 1, mars 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03260-6.
- [79] A. F. Palazzo et E. S. Lee, « Non-coding RNA: what is functional and what is junk? », *Front. Genet.*, vol. 6, 2015, Consulté le: 13 avril 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2015.00002>
- [80] K. Carrion *et al.*, « The long non-coding HOTAIR is modulated by cyclic stretch and WNT/ β -CATENIN in human aortic valve cells and is a novel repressor of calcification genes », *PLoS One*, vol. 9, n° 5, p. e96577, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0096577.
- [81] I. Gošev *et al.*, « Epigenome alterations in aortic valve stenosis and its related left ventricular hypertrophy », *Clin. Epigenetics*, vol. 9, n° 1, p. 106, oct. 2017, doi: 10.1186/s13148-017-0406-7.
- [82] M. Zhang *et al.*, « MicroRNA-30b is a multifunctional regulator of aortic valve interstitial cells », *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 147, n° 3, p. 1073-1080.e2, mars 2014, doi: 10.1016/j.jtcvs.2013.05.011.
- [83] W. Jiao *et al.*, « MicroRNA-638 inhibits human aortic valve interstitial cell calcification by targeting Sp7 », *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 23, n° 8, p. 5292-5302, 2019, doi: 10.1111/jcmm.14405.
- [84] P. Lu, B. Yin, et L. Liu, « MicroRNA-138 Suppresses Osteoblastic Differentiation of Valvular Interstitial Cells in Degenerative Calcific Aortic Valve Disease », *Int. Heart. J.*, vol. 60, n° 1, p. 136-144, 2019, doi: 10.1536/ihj.18-086.
- [85] B. Yanagawa *et al.*, « miRNA-141 is a novel regulator of BMP-2-mediated calcification in aortic stenosis », *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 144, n° 1, p. 256-262, juill. 2012, doi: 10.1016/j.jtcvs.2011.10.097.
- [86] M. Fang *et al.*, « Mir-29b promotes human aortic valve interstitial cell calcification via inhibiting TGF- β 3 through activation of wnt3/ β -catenin/Smad3 signaling », *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, n° 7, p. 5175-5185, 2018, doi: 10.1002/jcb.26545.
- [87] D. Zheng *et al.*, « MicroRNA-214 promotes the calcification of human aortic valve interstitial cells through the acceleration of inflammatory reactions with activated MyD88/NF- κ B signaling », *Clin. Res. Cardiol. Off. J. Ger. Card. Soc.*, vol. 108, n° 6, p. 691-702, juin 2019, doi: 10.1007/s00392-018-1398-9.
- [88] F. Hadji *et al.*, « Altered DNA Methylation of Long Noncoding RNA H19 in Calcific Aortic Valve Disease Promotes Mineralization by Silencing NOTCH1 », *Circulation*, vol. 134, n° 23, p. 1848-1862, déc. 2016, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023116.
- [89] E. Nagy et M. Bäck, « Epigenetic regulation of 5-lipoxygenase in the phenotypic plasticity of valvular interstitial cells associated with aortic valve stenosis », *FEBS Lett.*, vol. 586, n° 9, p. 1325-1329, mai 2012, doi: 10.1016/j.febslet.2012.03.039.

- [90] L. J. Anstine, C. Bobba, S. Ghadiali, et J. Lincoln, « Growth and maturation of heart valves leads to changes in endothelial cell distribution, impaired function, decreased metabolism and reduced cell proliferation », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 100, p. 72-82, nov. 2016, doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.10.006.
- [91] S. R. Aggarwal *et al.*, « Sex differences in aortic valve calcification measured by multidetector computed tomography in aortic stenosis », *Circ. Cardiovasc. Imaging*, vol. 6, n° 1, p. 40-47, janv. 2013, doi: 10.1161/CIRCIMAGING.112.980052.
- [92] C. M. McCoy, D. Q. Nicholas, et K. S. Masters, « Sex-related differences in gene expression by porcine aortic valvular interstitial cells », *PloS One*, vol. 7, n° 7, p. e39980, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0039980.
- [93] Y. Shan et P. A. Pellikka, « Aortic stenosis in women », *Heart Br. Card. Soc.*, vol. 106, n° 13, p. 970-976, juill. 2020, doi: 10.1136/heartjnl-2019-315407.
- [94] V. I. Summerhill, D. Moschetta, A. N. Orekhov, P. Poggio, et V. A. Myasoedova, « Sex-Specific Features of Calcific Aortic Valve Disease », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n° 16, p. E5620, août 2020, doi: 10.3390/ijms21165620.
- [95] C. Z. Zigelman et P. M. Edelstein, « Aortic Valve Stenosis », *Anesthesiol. Clin.*, vol. 27, n° 3, p. 519-532, sept. 2009, doi: 10.1016/j.anclin.2009.07.012.
- [96] A. Vahanian *et al.*, « 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) », *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed.*, vol. 75, n° 6, p. 524, juin 2022, doi: 10.1016/j.rec.2022.05.006.
- [97] I. Ben-Dor *et al.*, « Correlates and causes of death in patients with severe symptomatic aortic stenosis who are not eligible to participate in a clinical trial of transcatheter aortic valve implantation », *Circulation*, vol. 122, n° 11 Suppl, p. S37-42, sept. 2010, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.926873.
- [98] A. B. Freitas-Ferraz *et al.*, « Aortic Stenosis and Small Aortic Annulus », *Circulation*, vol. 139, n° 23, p. 2685-2702, juin 2019, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038408.
- [99] M. H. Kwon et C. W. Baird, « Surgical Valve Choices for Pulmonary Valve Replacement », *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 0, n° 0, févr. 2022, doi: 10.1053/j.semtevs.2022.01.006.
- [100] S. J. Cowell *et al.*, « A Randomized Trial of Intensive Lipid-Lowering Therapy in Calcific Aortic Stenosis », *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, n° 23, p. 2389-2397, juin 2005, doi: 10.1056/NEJMoa043876.
- [101] K. K. Teo, D. J. Corsi, J. W. Tam, J. G. Dumesnil, et K. L. Chan, « Lipid Lowering on Progression of Mild to Moderate Aortic Stenosis: Meta-analysis of the Randomized Placebo-Controlled Clinical Trials on 2344 Patients », *Can. J. Cardiol.*, vol. 27, n° 6, p. 800-808, nov. 2011, doi: 10.1016/j.cjca.2011.03.012.
- [102] K. L. Chan, K. Teo, J. G. Dumesnil, A. Ni, J. Tam, et ASTRONOMER Investigators, « Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis

- progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial », *Circulation*, vol. 121, n° 2, p. 306-314, janv. 2010, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.900027.
- [103] E. R. Mohler, « Mechanisms of aortic valve calcification », *Am. J. Cardiol.*, vol. 94, n° 11, p. 1396-1402, A6, déc. 2004, doi: 10.1016/j.amjcard.2004.08.013.
- [104] P. Sucosky, K. Balachandran, A. Elhammali, H. Jo, et A. P. Yoganathan, « Altered Shear Stress Stimulates Upregulation of Endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF- β 1-Dependent Pathway », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, n° 2, p. 254-260, févr. 2009, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.176347.
- [105] L. Sun, N. M. Rajamannan, et P. Sucosky, « Defining the Role of Fluid Shear Stress in the Expression of Early Signaling Markers for Calcific Aortic Valve Disease », *PLOS ONE*, vol. 8, n° 12, p. e84433, déc. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0084433.
- [106] A. E. Kostyunin, A. E. Yuzhalin, E. A. Ovcharenko, et A. G. Kutikhin, « Development of calcific aortic valve disease: Do we know enough for new clinical trials? », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 132, p. 189-209, juill. 2019, doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.05.016.
- [107] M. R. Dweck *et al.*, « Assessment of Valvular Calcification and Inflammation by Positron Emission Tomography in Patients With Aortic Stenosis », *Circulation*, vol. 125, n° 1, p. 76-86, janv. 2012, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.051052.
- [108] S. E. P. New, E. Aikawa, et D. A. Towler, « Molecular Imaging Insights Into Early Inflammatory Stages of Arterial and Aortic Valve Calcification », *Circ. Res.*, vol. 108, n° 11, p. 1381-1391, mai 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234146.
- [109] G. Marincheva-Savcheva *et al.*, « Imaging of the Aortic Valve Using Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography: Increased Valvular Fluorodeoxyglucose Uptake in Aortic Stenosis », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 57, n° 25, p. 2507-2515, juin 2011, doi: 10.1016/j.jacc.2010.12.046.
- [110] N. Coté *et al.*, « Inflammation Is Associated with the Remodeling of Calcific Aortic Valve Disease », *Inflammation*, vol. 36, n° 3, p. 573-581, juin 2013, doi: 10.1007/s10753-012-9579-6.
- [111] P. Mathieu, R. Bouchareb, et M.-C. Boulanger, « Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease », *J. Immunol. Res.*, vol. 2015, p. 851945, 2015, doi: 10.1155/2015/851945.
- [112] H. D. Wu *et al.*, « The lymphocytic infiltration in calcific aortic stenosis predominantly consists of clonally expanded T cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 178, n° 8, p. 5329-5339, avr. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.178.8.5329.
- [113] R. Winchester *et al.*, « Circulating activated and effector memory T cells are associated with calcification and clonal expansions in bicuspid and tricuspid valves of calcific aortic stenosis », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 187, n° 2, p. 1006-1014, juill. 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1003521.
- [114] D. El Hussein *et al.*, « P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: Implication for calcific aortic valve disease », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 72, p. 146-156, juill. 2014, doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.02.014.

- [115] J. Zhou, J. Zhu, L. Jiang, B. Zhang, D. Zhu, et Y. Wu, « Interleukin 18 promotes myofibroblast activation of valvular interstitial cells », *Int. J. Cardiol.*, vol. 221, p. 998-1003, oct. 2016, doi: 10.1016/j.ijcard.2016.07.036.
- [116] Q. Zeng *et al.*, « Interleukin-37 suppresses the osteogenic responses of human aortic valve interstitial cells in vitro and alleviates valve lesions in mice », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, n° 7, p. 1631-1636, févr. 2017, doi: 10.1073/pnas.1619667114.
- [117] G. A. Walker, K. S. Masters, D. N. Shah, K. S. Anseth, et L. A. Leinwand, « Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease », *Circ. Res.*, vol. 95, n° 3, p. 253-260, août 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000136520.07995.aa.
- [118] M. C. Cushing, P. D. Mariner, J.-T. Liao, E. A. Sims, et K. S. Anseth, « Fibroblast growth factor represses Smad-mediated myofibroblast activation in aortic valvular interstitial cells », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 22, n° 6, p. 1769-1777, juin 2008, doi: 10.1096/fj.07-087627.
- [119] J. N. Clark-Greuel *et al.*, « Transforming Growth Factor- β 1 Mechanisms in Aortic Valve Calcification: Increased Alkaline Phosphatase and Related Events », *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 83, n° 3, p. 946-953, mars 2007, doi: 10.1016/j.athoracsur.2006.10.026.
- [120] G. Paranya *et al.*, « Aortic Valve Endothelial Cells Undergo Transforming Growth Factor- β -Mediated and Non-Transforming Growth Factor- β -Mediated Transdifferentiation in Vitro », *Am. J. Pathol.*, vol. 159, n° 4, p. 1335-1343, oct. 2001, doi: 10.1016/S0002-9440(10)62520-5.
- [121] G. J. Mahler, E. J. Farrar, et J. T. Butcher, « Inflammatory Cytokines Promote Mesenchymal Transformation in Embryonic and Adult Valve Endothelial Cells », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, n° 1, p. 121-130, janv. 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300504.
- [122] D. Das *et al.*, « TGF-beta1-Induced MAPK activation promotes collagen synthesis, nodule formation, redox stress and cellular senescence in porcine aortic valve interstitial cells », *J. Heart Valve Dis.*, vol. 22, n° 5, p. 621-630, sept. 2013.
- [123] N. Osman *et al.*, « Smad2-dependent glycosaminoglycan elongation in aortic valve interstitial cells enhances binding of LDL to proteoglycans », *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, vol. 22, n° 2, p. 146-155, avr. 2013, doi: 10.1016/j.carpath.2012.07.002.
- [124] J. D. Hutcheson, L. M. Ryzhova, V. Setola, et W. D. Merryman, « 5-HT(2B) antagonism arrests non-canonical TGF- β 1-induced valvular myofibroblast differentiation », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 53, n° 5, p. 707-714, nov. 2012, doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.08.012.
- [125] J. D. Hutcheson *et al.*, « Cadherin-11 regulates cell-cell tension necessary for calcific nodule formation by valvular myofibroblasts », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, n° 1, p. 114-120, janv. 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300278.
- [126] A. V. Villar *et al.*, « Plasma Levels of Transforming Growth Factor- β 1 Reflect Left Ventricular Remodeling in Aortic Stenosis », *PLOS ONE*, vol. 4, n° 12, p. e8476, déc. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0008476.

- [127] A. Rutkovskiy *et al.*, « Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification », *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 6, n° 9, 14 2017, doi: 10.1161/JAHA.117.006339.
- [128] M. R. Kreke, L. A. Sharp, Y. W. Lee, et A. S. Goldstein, « Effect of intermittent shear stress on mechanotransductive signaling and osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells », *Tissue Eng. Part A*, vol. 14, n° 4, p. 529-537, avr. 2008, doi: 10.1089/tea.2007.0068.
- [129] M. Passmore *et al.*, « Osteopontin alters endothelial and valvular interstitial cell behaviour in calcific aortic valve stenosis through HMGB1 regulation », *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.*, vol. 48, n° 3, p. e20-29, sept. 2015, doi: 10.1093/ejcts/ezv244.
- [130] I. Fernández-Pisonero *et al.*, « Synergy between sphingosine 1-phosphate and lipopolysaccharide signaling promotes an inflammatory, angiogenic and osteogenic response in human aortic valve interstitial cells », *PLoS One*, vol. 9, n° 9, p. e109081, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0109081.
- [131] X. Meng *et al.*, « Expression of functional Toll-like receptors 2 and 4 in human aortic valve interstitial cells: potential roles in aortic valve inflammation and stenosis », *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 294, n° 1, p. C29-35, janv. 2008, doi: 10.1152/ajpcell.00137.2007.
- [132] A. Mahmut *et al.*, « Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 63, n° 5, p. 460-469, févr. 2014, doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.105.
- [133] K. Suzuki *et al.*, « The expression of groups IIE and V phospholipase A2 is associated with an increased expression of osteogenic molecules in human calcified aortic valves », *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 21, n° 12, p. 1308-1325, 2014, doi: 10.5551/jat.24273.
- [134] R. Bouchareb *et al.*, « Autotaxin Derived From Lipoprotein(a) and Valve Interstitial Cells Promotes Inflammation and Mineralization of the Aortic Valve », *Circulation*, vol. 132, n° 8, p. 677-690, août 2015, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016757.
- [135] E. Branchetti *et al.*, « Antioxidant enzymes reduce DNA damage and early activation of valvular interstitial cells in aortic valve sclerosis », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, n° 2, p. e66-74, févr. 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300177.
- [136] C. Côté *et al.*, « Association between circulating oxidised low-density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis », *Heart*, vol. 94, n° 9, p. 1175-1180, sept. 2008, doi: 10.1136/hrt.2007.125740.
- [137] S. Helske, M. Kupari, K. A. Lindstedt, et P. T. Kovanen, « Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process », *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 18, n° 5, p. 483-491, oct. 2007, doi: 10.1097/MOL.0b013e3282a66099.
- [138] N. A. Nadlonek, J. H. Lee, M. J. Weyant, X. Meng, et D. A. Fullerton, « ox-LDL induces PiT-1 expression in human aortic valve interstitial cells », *J. Surg. Res.*, vol. 184, n° 1, p. 6-9, sept. 2013, doi: 10.1016/j.jss.2013.05.001.
- [139] C. García-Rodríguez, I. Parra-Izquierdo, I. Castaños-Mollor, J. López, J. A. San Román, et M. Sánchez Crespo, « Toll-Like Receptors, Inflammation, and Calcific Aortic Valve Disease »,

Front. Physiol., vol. 9, 2018, Consulté le: 12 avril 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.00201>

- [140] H. N. Hutson, T. Marohl, M. Anderson, K. Eliceiri, P. Campagnola, et K. S. Masters, « Calcific Aortic Valve Disease Is Associated with Layer-Specific Alterations in Collagen Architecture », *PLOS ONE*, vol. 11, n° 9, p. e0163858, sept. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0163858.
- [141] O. Fondard *et al.*, « Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors », *Eur. Heart J.*, vol. 26, n° 13, p. 1333-1341, juill. 2005, doi: 10.1093/eurheartj/ehi248.
- [142] E. Rabkin-Aikawa, M. Farber, M. Aikawa, et F. J. Schoen, « Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves », *J. Heart Valve Dis.*, vol. 13, n° 5, p. 841-847, sept. 2004.
- [143] S. Xu, A. C. Liu, H. Kim, et A. I. Gotlieb, « Cell density regulates in vitro activation of heart valve interstitial cells », *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, vol. 21, n° 2, p. 65-73, avr. 2012, doi: 10.1016/j.carpath.2011.01.004.
- [144] M. C. Cushing, J.-T. Liao, et K. S. Anseth, « Activation of valvular interstitial cells is mediated by transforming growth factor-beta1 interactions with matrix molecules », *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, vol. 24, n° 6, p. 428-437, sept. 2005, doi: 10.1016/j.matbio.2005.06.007.
- [145] J.-H. Chen, W. L. K. Chen, K. L. Sider, C. Y. Y. Yip, et C. A. Simmons, « β -catenin mediates mechanically regulated, transforming growth factor- β 1-induced myofibroblast differentiation of aortic valve interstitial cells », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, n° 3, p. 590-597, mars 2011, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.220061.
- [146] T. C. Lee, R. J. Midura, V. C. Hascall, et I. Vesely, « The effect of elastin damage on the mechanics of the aortic valve », *J. Biomech.*, vol. 34, n° 2, p. 203-210, févr. 2001, doi: 10.1016/s0021-9290(00)00187-1.
- [147] E. H. Stephens *et al.*, « Differential proteoglycan and hyaluronan distribution in calcified aortic valves », *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, vol. 20, n° 6, p. 334-342, déc. 2011, doi: 10.1016/j.carpath.2010.10.002.
- [148] E. H. Stephens, C.-K. Chu, et K. J. Grande-Allen, « Valve proteoglycan content and glycosaminoglycan fine structure are unique to microstructure, mechanical load and age: Relevance to an age-specific tissue-engineered heart valve », *Acta Biomater.*, vol. 4, n° 5, p. 1148-1160, sept. 2008, doi: 10.1016/j.actbio.2008.03.014.
- [149] S. Lehmann *et al.*, « Mechanical strain and the aortic valve: influence on fibroblasts, extracellular matrix, and potential stenosis », *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 88, n° 5, p. 1476-1483, nov. 2009, doi: 10.1016/j.athoracsur.2009.07.025.
- [150] H. Derbali *et al.*, « Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2 », *Am. J. Pathol.*, vol. 176, n° 6, p. 2638-2645, juin 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.090541.

- [151] P. Snider *et al.*, « Periostin is required for maturation and extracellular matrix stabilization of noncardiomyocyte lineages of the heart », *Circ. Res.*, vol. 102, n° 7, p. 752-760, avr. 2008, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.159517.
- [152] M. Bogdanova *et al.*, « Inflammation and Mechanical Stress Stimulate Osteogenic Differentiation of Human Aortic Valve Interstitial Cells », *Front. Physiol.*, vol. 9, p. 1635, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.01635.
- [153] B. Jian, P. L. Jones, Q. Li, E. R. Mohler, F. J. Schoen, et R. J. Levy, « Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis », *Am. J. Pathol.*, vol. 159, n° 1, p. 321-327, juill. 2001, doi: 10.1016/S0002-9440(10)61698-7.
- [154] J. J. Kaden *et al.*, « Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis », *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, vol. 14, n° 2, p. 80-87, avr. 2005, doi: 10.1016/j.carpath.2005.01.002.
- [155] S. Helske *et al.*, « Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, n° 8, p. 1791-1798, août 2006, doi: 10.1161/01.ATV.0000228824.01604.63.
- [156] Y. Bossé, A. Miqdad, D. Fournier, A. Pépin, P. Pibarot, et P. Mathieu, « Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves », *Circ. Cardiovasc. Genet.*, vol. 2, n° 5, p. 489-498, oct. 2009, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.108.820795.
- [157] F. Li *et al.*, « ADAMTS5 Deficiency in Calcified Aortic Valves Is Associated With Elevated Pro-Osteogenic Activity in Valvular Interstitial Cells », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 37, n° 7, p. 1339-1351, juill. 2017, doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309021.
- [158] A. Di Vito *et al.*, « Extracellular Matrix in Calcific Aortic Valve Disease: Architecture, Dynamic and Perspectives », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n° 2, janv. 2021, doi: 10.3390/ijms22020913.
- [159] N. M. Rajamannan *et al.*, « Calcified rheumatic valve neoangiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression and osteoblast-like bone formation », *Circulation*, vol. 111, n° 24, p. 3296-3301, juin 2005, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.473165.
- [160] F. Chalajour *et al.*, « Identification and characterization of cells with high angiogenic potential and transitional phenotype in calcific aortic valve », *Exp. Cell Res.*, vol. 313, n° 11, p. 2326-2335, juill. 2007, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.02.033.
- [161] F. Chalajour, H. Treede, A. Ebrahimnejad, H. Lauke, H. Reichensperner, et S. Ergun, « Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis », *Exp. Cell Res.*, vol. 298, n° 2, p. 455-464, août 2004, doi: 10.1016/j.yexcr.2004.04.034.
- [162] H. Funaki *et al.*, « Expression and Localization of Angiogenic Inhibitory Factor, Chondromodulin-I, in Adult Rat Eye », *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 42, n° 6, p. 1193-1200, mai 2001.
- [163] Y. Hiraki *et al.*, « Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor. Purification and its localization in the avascular zone of epiphyseal cartilage », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 51, p. 32419-32426, déc. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.51.32419.

- [164] Y. Hiraki, T. Kono, M. Sato, C. Shukunami, et J. Kondo, « Inhibition of DNA synthesis and tube morphogenesis of cultured vascular endothelial cells by chondromodulin-I », *FEBS Lett.*, vol. 415, n° 3, p. 321-324, oct. 1997, doi: 10.1016/s0014-5793(97)01151-4.
- [165] M. Yoshioka *et al.*, « Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis », *Nat. Med.*, vol. 12, n° 10, Art. n° 10, oct. 2006, doi: 10.1038/nm1476.
- [166] X. Liu et Z. Xu, « Osteogenesis in calcified aortic valve disease: From histopathological observation towards molecular understanding », *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 122, n° 2, p. 156-161, nov. 2016, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2016.02.002.
- [167] E. L. Monzack et K. S. Masters, « Can valvular interstitial cells become true osteoblasts?: A side-by-side comparison », *J. Heart Valve Dis.*, vol. 20, n° 4, p. 449-463, juill. 2011.
- [168] V. Menon et J. Lincoln, « The Genetic Regulation of Aortic Valve Development and Calcific Disease », *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 5, p. 162, nov. 2018, doi: 10.3389/fcvm.2018.00162.
- [169] J.-H. Chen, C. Y. Y. Yip, E. D. Sone, et C. A. Simmons, « Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential », *Am. J. Pathol.*, vol. 174, n° 3, p. 1109-1119, mars 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.080750.
- [170] K. Xu *et al.*, « Cell-Type Transcriptome Atlas of Human Aortic Valves Reveal Cell Heterogeneity and Endothelial to Mesenchymal Transition Involved in Calcific Aortic Valve Disease », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 40, n° 12, p. 2910-2921, déc. 2020, doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314789.
- [171] E. R. Mohler, F. Gannon, C. Reynolds, R. Zimmerman, M. G. Keane, et F. S. Kaplan, « Bone formation and inflammation in cardiac valves », *Circulation*, vol. 103, n° 11, p. 1522-1528, mars 2001, doi: 10.1161/01.cir.103.11.1522.
- [172] S. Cappelli *et al.*, « Aortic valve disease and gamma-glutamyltransferase: Accumulation in tissue and relationships with calcific degeneration », *Atherosclerosis*, vol. 213, n° 2, p. 385-391, déc. 2010, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.08.063.
- [173] G. J. Lis *et al.*, « Influence of osteoclasts and osteoprotegerin on the mode of calcific degeneration of aortic valves », *Pol. Arch. Intern. Med.*, vol. 126, n° 3, p. 149-158, mars 2016, doi: 10.20452/pamw.3326.
- [174] L. Osman, M. H. Yacoub, N. Latif, M. Amrani, et A. H. Chester, « Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin », *Circulation*, vol. 114, n° 1 Suppl, p. I547-552, juill. 2006, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001115.
- [175] A. Farzaneh-Far, D. Proudfoot, C. Shanahan, et P. L. Weissberg, « Vascular and valvar calcification: recent advances », *Heart Br. Card. Soc.*, vol. 85, n° 1, p. 13-17, janv. 2001, doi: 10.1136/heart.85.1.13.
- [176] P. Mathieu et M.-C. Boulanger, « Basic Mechanisms of Calcific Aortic Valve Disease », *Can. J. Cardiol.*, vol. 30, n° 9, p. 982-993, sept. 2014, doi: 10.1016/j.cjca.2014.03.029.
- [177] X. Yang *et al.*, « Bone morphogenic protein 2 induces Runx2 and osteopontin expression in human aortic valve interstitial cells: role of Smad1 and extracellular signal-regulated kinase

- 1/2 », *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 138, n° 4, p. 1008-1015, oct. 2009, doi: 10.1016/j.jtcvs.2009.06.024.
- [178] N. M. Rajamannan, M. Subramaniam, F. Caira, S. R. Stock, et T. C. Spelsberg, « Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced calcification in the aortic valves via the Lrp5 receptor pathway », *Circulation*, vol. 112, n° 9 Suppl, p. I229-234, août 2005, doi: 10.1161/01.CIRCULATIONAHA.104.524306.
- [179] N. M. Rajamannan *et al.*, « Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype », *Circulation*, vol. 107, n° 17, p. 2181-2184, mai 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000070591.21548.69.
- [180] J. J. Kaden *et al.*, « Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis », *J. Heart Valve Dis.*, vol. 13, n° 4, p. 560-566, juill. 2004.
- [181] I. Albanese *et al.*, « Role of Noncanonical Wnt Signaling Pathway in Human Aortic Valve Calcification », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 37, n° 3, p. 543-552, mars 2017, doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308394.
- [182] J. D. Miller, Y. Chu, R. M. Brooks, W. E. Richenbacher, R. Peña-Silva, et D. D. Heistad, « Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 52, n° 10, p. 843-850, sept. 2008, doi: 10.1016/j.jacc.2008.05.043.
- [183] J. D. Peacock, A. K. Levay, D. B. Gillaspie, G. Tao, et J. Lincoln, « Reduced sox9 function promotes heart valve calcification phenotypes in vivo », *Circ. Res.*, vol. 106, n° 4, p. 712-719, mars 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.213702.
- [184] M. Fang, C. M. Alfieri, A. Hulin, S. J. Conway, et K. E. Yutzey, « Loss of β -catenin promotes chondrogenic differentiation of aortic valve interstitial cells », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 34, n° 12, p. 2601-2608, déc. 2014, doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304579.
- [185] A. Alexopoulos *et al.*, « Bone regulatory factors NFATc1 and Osterix in human calcific aortic valves », *Int. J. Cardiol.*, vol. 139, n° 2, p. 142-149, mars 2010, doi: 10.1016/j.ijcard.2008.10.014.
- [186] F. C. Caira *et al.*, « Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 47, n° 8, p. 1707-1712, avr. 2006, doi: 10.1016/j.jacc.2006.02.040.
- [187] A. Acharya *et al.*, « Inhibitory role of Notch1 in calcific aortic valve disease », *PloS One*, vol. 6, n° 11, p. e27743, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0027743.
- [188] D. Hakuno, N. Kimura, M. Yoshioka, et K. Fukuda, « Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease », *J. Mol. Med.*, vol. 87, n° 1, p. 17, sept. 2008, doi: 10.1007/s00109-008-0400-9.
- [189] Q. Zeng *et al.*, « Notch1 promotes the pro-osteogenic response of human aortic valve interstitial cells via modulation of ERK1/2 and nuclear factor- κ B activation », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, n° 7, p. 1580-1590, juill. 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300912.

- [190] X.-W. Zhang *et al.*, « Twist-related protein 1 negatively regulated osteoblastic transdifferentiation of human aortic valve interstitial cells by directly inhibiting runt-related transcription factor 2 », *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 148, n° 4, p. 1700-1708.e1, oct. 2014, doi: 10.1016/j.jtcvs.2014.02.084.
- [191] D. J. Huk *et al.*, « Valve Endothelial Cell-Derived Tgfβ1 Signaling Promotes Nuclear Localization of Sox9 in Interstitial Cells Associated With Attenuated Calcification », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 36, n° 2, p. 328-338, févr. 2016, doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306091.
- [192] J. Hjortnaes *et al.*, « Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells », *Atherosclerosis*, vol. 242, n° 1, p. 251-260, sept. 2015, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.008.
- [193] S. T. Gould, E. E. Matherly, J. N. Smith, D. D. Heistad, et K. S. Anseth, « The role of valvular endothelial cell paracrine signaling and matrix elasticity on valvular interstitial cell activation », *Biomaterials*, vol. 35, n° 11, p. 3596-3606, avr. 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.005.
- [194] M. P. White *et al.*, « NOTCH1 regulates matrix gla protein and calcification gene networks in human valve endothelium », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 84, p. 13-23, juill. 2015, doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.006.
- [195] T. W. Gee, J. M. Richards, A. Mahmut, et J. T. Butcher, « Valve endothelial-interstitial interactions drive emergent complex calcific lesion formation in vitro », *Biomaterials*, vol. 269, p. 120669, févr. 2021, doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120669.
- [196] M. Vadana *et al.*, « Parathyroid Hormone Induces Human Valvular Endothelial Cells Dysfunction That Impacts the Osteogenic Phenotype of Valvular Interstitial Cells », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n° 7, p. 3776, mars 2022, doi: 10.3390/ijms23073776.
- [197] C.-P. D. Hsu *et al.*, « Valve Endothelial Cell Exposure to High Levels of Flow Oscillations Exacerbates Valve Interstitial Cell Calcification », *Bioeng. Basel Switz.*, vol. 9, n° 8, p. 393, août 2022, doi: 10.3390/bioengineering9080393.
- [198] C. Herbst *et al.*, « Chemotherapy alone versus chemotherapy plus radiotherapy for early stage Hodgkin lymphoma », *Cochrane Database Syst. Rev.*, n° 2, p. CD007110, févr. 2011, doi: 10.1002/14651858.CD007110.pub2.
- [199] D. M. Gujral, G. Lloyd, et S. Bhattacharyya, « Radiation-induced valvular heart disease », *Heart*, vol. 102, n° 4, p. 269-276, févr. 2016, doi: 10.1136/heartjnl-2015-308765.
- [200] R. G. Carlson, W. R. Mayfield, S. Normann, et J. A. Alexander, « Radiation-Associated Valvular Disease* », *Chest*, vol. 99, n° 3, p. 538-545, mars 1991, doi: 10.1378/chest.99.3.538.
- [201] G. Kleikamp, U. Schnepfer, et R. Körfer, « Coronary Artery and Aortic Valve Disease as a Long-Term Sequel of Mediastinal and Thoracic Irradiation », *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 45, n° 1, p. 27-31, févr. 1997, doi: 10.1055/s-2007-1013679.
- [202] L. Cella, R. Liuzzi, M. Conson, V. D'Avino, M. Salvatore, et R. Pacelli, « Multivariate Normal Tissue Complication Probability Modeling of Heart Valve Dysfunction in Hodgkin Lymphoma

- Survivors », *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 87, n° 2, p. 304-310, oct. 2013, doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.05.049.
- [203] I. Šteiner, « Pathology of radiation induced heart disease », *Rep. Pract. Oncol. Radiother.*, vol. 25, n° 2, p. 178-181, mars 2020, doi: 10.1016/j.rpor.2019.12.015.
- [204] D. J. Cutter *et al.*, « Risk of valvular heart disease after treatment for Hodgkin lymphoma », *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 107, n° 4, p. djv008, avr. 2015, doi: 10.1093/jnci/djv008.
- [205] S. L. Galper *et al.*, « Clinically significant cardiac disease in patients with Hodgkin lymphoma treated with mediastinal irradiation », *Blood*, vol. 117, n° 2, p. 412-418, janv. 2011, doi: 10.1182/blood-2010-06-291328.
- [206] E. Donnellan *et al.*, « Rate of Progression of Aortic Stenosis and its Impact on Outcomes in Patients With Radiation-Associated Cardiac Disease: A Matched Cohort Study », *JACC Cardiovasc. Imaging*, vol. 11, n° 8, p. 1072-1080, août 2018, doi: 10.1016/j.jcmg.2018.04.019.
- [207] M. J. Hooning *et al.*, « Long-term risk of cardiovascular disease in 10-year survivors of breast cancer », *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 99, n° 5, p. 365-375, mars 2007, doi: 10.1093/jnci/djk064.
- [208] P. McGale *et al.*, « Incidence of heart disease in 35,000 women treated with radiotherapy for breast cancer in Denmark and Sweden », *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, vol. 100, n° 2, p. 167-175, août 2011, doi: 10.1016/j.radonc.2011.06.016.
- [209] M. C. Hull, C. G. Morris, C. J. Pepine, et N. P. Mendenhall, « Valvular dysfunction and carotid, subclavian, and coronary artery disease in survivors of hodgkin lymphoma treated with radiation therapy », *JAMA*, vol. 290, n° 21, p. 2831-2837, déc. 2003, doi: 10.1001/jama.290.21.2831.
- [210] T. Wei et Y. Cheng, « The cardiac toxicity of radiotherapy - a review of characteristics, mechanisms, diagnosis, and prevention », *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 97, n° 10, p. 1333-1340, 2021, doi: 10.1080/09553002.2021.1956007.
- [211] J. Yarnold et M.-C. Vozenin Brotons, « Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis », *Radiother. Oncol.*, vol. 97, n° 1, p. 149-161, oct. 2010, doi: 10.1016/j.radonc.2010.09.002.
- [212] J. W. van Rijswijk *et al.*, « Fibrotic aortic valve disease after radiotherapy: an immunohistochemical study in breast cancer and lymphoma patients », *Cardiovasc. Pathol.*, vol. 45, p. 107176, mars 2020, doi: 10.1016/j.carpath.2019.107176.
- [213] N. A. Nadlonek *et al.*, « Radiation induces osteogenesis in human aortic valve interstitial cells », *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 144, n° 6, p. 1466-1470, déc. 2012, doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.08.041.
- [214] M. Meerman *et al.*, « Radiation Induces Valvular Interstitial Cell Calcific Response in an in vitro Model of Calcific Aortic Valve Disease », *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 8, p. 687885, 2021, doi: 10.3389/fcvm.2021.687885.
- [215] D. J. Cosens et A. Manning, « Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant », *Nature*, vol. 224, n° 5216, Art. n° 5216, oct. 1969, doi: 10.1038/224285a0.

- [216] C. Montell et G. M. Rubin, « Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction », *Neuron*, vol. 2, n° 4, p. 1313-1323, avr. 1989, doi: 10.1016/0896-6273(89)90069-X.
- [217] B. Nilius et G. Owsianik, « The transient receptor potential family of ion channels », *Genome Biol.*, vol. 12, n° 3, p. 218, 2011, doi: 10.1186/gb-2011-12-3-218.
- [218] M. Gees, B. Colsoul, et B. Nilius, « The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, n° 10, p. a003962, oct. 2010, doi: 10.1101/cshperspect.a003962.
- [219] C. Montell, « The TRP superfamily of cation channels », *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.*, vol. 2005, n° 272, p. re3, févr. 2005, doi: 10.1126/stke.2722005re3.
- [220] T. Hof, S. Chaigne, A. Récalde, L. Sallé, F. Brette, et R. Guinamard, « Transient receptor potential channels in cardiac health and disease », *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 16, n° 6, p. 344-360, juin 2019, doi: 10.1038/s41569-018-0145-2.
- [221] E. Heckel *et al.*, « Oscillatory Flow Modulates Mechanosensitive klf2a Expression through trpv4 and trpp2 during Heart Valve Development », *Curr. Biol. CB*, vol. 25, n° 10, p. 1354-1361, mai 2015, doi: 10.1016/j.cub.2015.03.038.
- [222] D. Batan *et al.*, « Hydrogel cultures reveal Transient Receptor Potential Vanilloid 4 regulation of myofibroblast activation and proliferation in valvular interstitial cells », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 36, n° 5, p. e22306, mai 2022, doi: 10.1096/fj.202101863R.
- [223] M. Harada *et al.*, « Transient receptor potential canonical-3 channel-dependent fibroblast regulation in atrial fibrillation », *Circulation*, vol. 126, n° 17, p. 2051-2064, oct. 2012, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.121830.
- [224] R. Macianskiene, I. Martisiene, D. Zablockaite, et V. Gendviliene, « Characterization of Mg²⁺-regulated TRPM7-like current in human atrial myocytes », *J. Biomed. Sci.*, vol. 19, p. 75, août 2012, doi: 10.1186/1423-0127-19-75.
- [225] Y.-H. Zhang *et al.*, « Evidence for functional expression of TRPM7 channels in human atrial myocytes », *Basic Res. Cardiol.*, vol. 107, n° 5, p. 282, sept. 2012, doi: 10.1007/s00395-012-0282-4.
- [226] Y.-H. Zhang *et al.*, « Functional transient receptor potential canonical type 1 channels in human atrial myocytes », *Pflugers Arch.*, vol. 465, n° 10, p. 1439-1449, oct. 2013, doi: 10.1007/s00424-013-1291-3.
- [227] E. W. Bush *et al.*, « Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 44, p. 33487-33496, nov. 2006, doi: 10.1074/jbc.M605536200.
- [228] H. Nakayama, B. J. Wilkin, I. Bodi, et J. D. Molkenin, « Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 20, n° 10, p. 1660-1670, août 2006, doi: 10.1096/fj.05-5560com.

- [229] A. Domínguez-Rodríguez, G. Ruiz-Hurtado, J. Sabourin, A. M. Gómez, J. L. Alvarez, et J.-P. Benitah, « Proarrhythmic effect of sustained EPAC activation on TRPC3/4 in rat ventricular cardiomyocytes », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 87, p. 74-78, oct. 2015, doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.07.002.
- [230] N. Koitabashi *et al.*, « Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 48, n° 4, p. 713-724, avr. 2010, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.11.015.
- [231] R. Guinamard, M. Demion, C. Magaud, D. Potreau, et P. Bois, « Functional expression of the TRPM4 cationic current in ventricular cardiomyocytes from spontaneously hypertensive rats », *Hypertens. Dallas Tex 1979*, vol. 48, n° 4, p. 587-594, oct. 2006, doi: 10.1161/01.HYP.0000237864.65019.a5.
- [232] K. Seo *et al.*, « Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, n° 4, p. 1551-1556, janv. 2014, doi: 10.1073/pnas.1308963111.
- [233] J. W. Han *et al.*, « Resistance to pathologic cardiac hypertrophy and reduced expression of CaV1.2 in Trpc3-depleted mice », *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 421, n° 1-2, p. 55-65, oct. 2016, doi: 10.1007/s11010-016-2784-0.
- [234] N. Kitajima *et al.*, « TRPC3-mediated Ca²⁺ influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 409, n° 1, p. 108-113, mai 2011, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.124.
- [235] B. Nilius *et al.*, « Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 33, p. 30813-30820, août 2003, doi: 10.1074/jbc.M305127200.
- [236] P. Launay, A. Fleig, A. L. Perraud, A. M. Scharenberg, R. Penner, et J. P. Kinet, « TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization », *Cell*, vol. 109, n° 3, p. 397-407, mai 2002, doi: 10.1016/s0092-8674(02)00719-5.
- [237] B. Nilius *et al.*, « Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4 », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 8, p. 6423-6433, févr. 2005, doi: 10.1074/jbc.M411089200.
- [238] M. Murakami, F. Xu, I. Miyoshi, E. Sato, K. Ono, et T. Iijima, « Identification and characterization of the murine TRPM4 channel », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 307, n° 3, p. 522-528, août 2003, doi: 10.1016/S0006-291X(03)01186-0.
- [239] J. C. Yoo *et al.*, « Cloning and characterization of rat transient receptor potential-melastatin 4 (TRPM4) », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 391, n° 1, p. 806-811, janv. 2010, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.142.
- [240] J. Guo, J. She, W. Zeng, Q. Chen, X.-C. Bai, et Y. Jiang, « Structures of the calcium-activated, non-selective cation channel TRPM4 », *Nature*, vol. 552, n° 7684, p. 205-209, déc. 2017, doi: 10.1038/nature24997.

- [241] H. E. Autzen, A. G. Myasnikov, M. G. Campbell, D. Asarnow, D. Julius, et Y. Cheng, « Structure of the human TRPM4 ion channel in a lipid nanodisc », *Science*, vol. 359, n° 6372, p. 228-232, janv. 2018, doi: 10.1126/science.aar4510.
- [242] B. Nilius *et al.*, « The selectivity filter of the cation channel TRPM4 », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 24, p. 22899-22906, juin 2005, doi: 10.1074/jbc.M501686200.
- [243] B. Nilius et R. Vennekens, « From cardiac cation channels to the molecular dissection of the transient receptor potential channel TRPM4 », *Pflugers Arch.*, vol. 453, n° 3, p. 313-321, déc. 2006, doi: 10.1007/s00424-006-0088-z.
- [244] B. Nilius, K. Talavera, G. Owsianik, J. Prenen, G. Droogmans, et T. Voets, « Gating of TRP channels: a voltage connection? », *J. Physiol.*, vol. 567, n° Pt 1, p. 35-44, août 2005, doi: 10.1113/jphysiol.2005.088377.
- [245] K. Talavera *et al.*, « Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste », *Nature*, vol. 438, n° 7070, Art. n° 7070, déc. 2005, doi: 10.1038/nature04248.
- [246] B. Nilius *et al.*, « The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate », *EMBO J.*, vol. 25, n° 3, p. 467-478, févr. 2006, doi: 10.1038/sj.emboj.7600963.
- [247] Y. Huang, R. Fliegert, A. H. Guse, W. Lü, et J. Du, « A structural overview of the ion channels of the TRPM family », *Cell Calcium*, vol. 85, p. 102111, janv. 2020, doi: 10.1016/j.ceca.2019.102111.
- [248] S. Yamaguchi, A. Tanimoto, S. Iwasa, et K.-I. Otsuguro, « TRPM4 and TRPM5 Channels Share Crucial Amino Acid Residues for Ca²⁺ Sensitivity but Not Significance of PI(4,5)P₂ », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, n° 8, p. E2012, avr. 2019, doi: 10.3390/ijms20082012.
- [249] Z. Zhang, H. Okawa, Y. Wang, et E. R. Liman, « Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate rescues TRPM4 channels from desensitization », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 47, p. 39185-39192, nov. 2005, doi: 10.1074/jbc.M506965200.
- [250] K. Bousova *et al.*, « PIP₂ and PIP₃ interact with N-terminus region of TRPM4 channel », *Biophys. Chem.*, vol. 205, p. 24-32, oct. 2015, doi: 10.1016/j.bpc.2015.06.004.
- [251] F. Simon *et al.*, « Hydrogen peroxide removes TRPM4 current desensitization conferring increased vulnerability to necrotic cell death », *J. Biol. Chem.*, vol. 285, n° 48, p. 37150-37158, nov. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.155390.
- [252] D. Sarmiento *et al.*, « Increases in reactive oxygen species enhance vascular endothelial cell migration through a mechanism dependent on the transient receptor potential melastatin 4 ion channel », *Microvasc. Res.*, vol. 98, p. 187-196, mars 2015, doi: 10.1016/j.mvr.2014.02.001.
- [253] X.-Q. Ding *et al.*, « Transient Receptor Potential Melastatin 4 (TRPM4) Contributes to High Salt Diet-Mediated Early-Stage Endothelial Injury », *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 41, n° 2, p. 835-848, 2017, doi: 10.1159/000459695.

- [254] V. Gerzanich, M. S. Kwon, S. K. Woo, A. Ivanov, et J. M. Simard, « SUR1-TRPM4 channel activation and phasic secretion of MMP-9 induced by tPA in brain endothelial cells », *PLoS One*, vol. 13, n° 4, p. e0195526, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0195526.
- [255] B. Nilius, J. Prenen, T. Voets, et G. Droogmans, « Intracellular nucleotides and polyamines inhibit the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4b », *Pflugers Arch.*, vol. 448, n° 1, p. 70-75, avr. 2004, doi: 10.1007/s00424-003-1221-x.
- [256] R. Guinamard, M. Rahmati, J. Lenfant, et P. Bois, « Characterization of a Ca²⁺-activated Nonselective Cation Channel during Dedifferentiation of Cultured Rat Ventricular Cardiomyocytes », *J. Membr. Biol.*, vol. 188, n° 2, p. 127-135, juill. 2002, doi: 10.1007/s00232-001-0180-4.
- [257] R. Guinamard *et al.*, « Functional characterization of a Ca²⁺-activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes », *J. Physiol.*, vol. 558, n° Pt 1, p. 75-83, juill. 2004, doi: 10.1113/jphysiol.2004.063974.
- [258] M. Demion, P. Bois, P. Launay, et R. Guinamard, « TRPM4, a Ca²⁺-activated nonselective cation channel in mouse sino-atrial node cells », *Cardiovasc. Res.*, vol. 73, n° 3, p. 531-538, févr. 2007, doi: 10.1016/j.cardiores.2006.11.023.
- [259] S. H. Suh, H. Watanabe, G. Droogmans, et B. Nilius, « ATP and nitric oxide modulate a Ca²⁺-activated non-selective cation current in macrovascular endothelial cells », *Pflug. Arch.*, vol. 444, n° 3, p. 438-445, juin 2002, doi: 10.1007/s00424-002-0825-x.
- [260] S. Ali *et al.*, « Nitric Oxide Signals Through IRAG to Inhibit TRPM4 Channels and Dilate Cerebral Arteries », *Function*, vol. 2, n° 6, p. zqab051, oct. 2021, doi: 10.1093/function/zqab051.
- [261] R. Guinamard, C. Simard, et L. Sallé, « TRPM4 », in *Encyclopedia of Signaling Molecules*, S. Choi, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 5741-5749. doi: 10.1007/978-3-319-67199-4_101882.
- [262] R. Takezawa *et al.*, « A Pyrazole Derivative Potently Inhibits Lymphocyte Ca²⁺ Influx and Cytokine Production by Facilitating Transient Receptor Potential Melastatin 4 Channel Activity », *Mol. Pharmacol.*, vol. 69, n° 4, p. 1413-1420, avr. 2006, doi: 10.1124/mol.105.021154.
- [263] Z. M. Kovács *et al.*, « Pharmacological Modulation and (Patho)Physiological Roles of TRPM4 Channel-Part 1: Modulation of TRPM4 », *Pharm. Basel Switz.*, vol. 15, n° 1, p. 81, janv. 2022, doi: 10.3390/ph15010081.
- [264] X. Chen, L. Feng, H. Yao, L. Yang, et Y. Qin, « Efficacy and safety of diazoxide for treating hyperinsulinemic hypoglycemia: A systematic review and meta-analysis », *PLOS ONE*, vol. 16, n° 2, p. e0246463, févr. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0246463.
- [265] S. K. Woo, M. S. Kwon, A. Ivanov, V. Gerzanich, et J. M. Simard, « The sulfonylurea receptor 1 (Sur1)-transient receptor potential melastatin 4 (Trpm4) channel », *J. Biol. Chem.*, vol. 288, n° 5, p. 3655-3667, févr. 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.428219.
- [266] T. Grand *et al.*, « 9-phenanthrol inhibits human TRPM4 but not TRPM5 cationic channels », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 153, n° 8, p. 1697-1705, avr. 2008, doi: 10.1038/bjp.2008.38.

- [267] B. Nilius, J. Prenen, A. Janssens, T. Voets, et G. Droogmans, « Decavanadate modulates gating of TRPM4 cation channels », *J. Physiol.*, vol. 560, n° Pt 3, p. 753-765, nov. 2004, doi: 10.1113/jphysiol.2004.070839.
- [268] N. D. Ullrich *et al.*, « Comparison of functional properties of the Ca²⁺-activated cation channels TRPM4 and TRPM5 from mice », *Cell Calcium*, vol. 37, n° 3, p. 267-278, mars 2005, doi: 10.1016/j.ceca.2004.11.001.
- [269] L. C. Ozthathil *et al.*, « Identification of potent and selective small molecule inhibitors of the cation channel TRPM4 », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 175, n° 12, p. 2504-2519, juin 2018, doi: 10.1111/bph.14220.
- [270] P. Arullampalam, B. Preti, D. Ross-Kaschitza, M. Lochner, J.-S. Rougier, et H. Abriel, « Species-Specific Effects of Cation Channel TRPM4 Small-Molecule Inhibitors », *Front. Pharmacol.*, vol. 12, p. 712354, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.712354.
- [271] H. Al-Shammari *et al.*, « Expression and function of mechanosensitive ion channels in human valve interstitial cells », *PloS One*, vol. 15, n° 10, p. e0240532, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0240532.
- [272] M. Demion *et al.*, « Trpm4 Gene Invalidation Leads to Cardiac Hypertrophy and Electrophysiological Alterations », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 12, p. e115256, déc. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0115256.
- [273] T. Hof, C. Simard, R. Rouet, L. Sallé, et R. Guinamard, « Implication of the TRPM4 nonselective cation channel in mammalian sinus rhythm », *Heart Rhythm*, vol. 10, n° 11, p. 1683-1689, nov. 2013, doi: 10.1016/j.hrthm.2013.08.014.
- [274] H. Liu *et al.*, « Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease », *Circ. Cardiovasc. Genet.*, vol. 3, n° 4, p. 374-385, août 2010, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.109.930867.
- [275] M. Kruse *et al.*, « Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I », *J. Clin. Invest.*, vol. 119, n° 9, p. 2737-2744, sept. 2009, doi: 10.1172/JCI38292.
- [276] T. Hof *et al.*, « TRPM4 non-selective cation channels influence action potentials in rabbit Purkinje fibres », *J. Physiol.*, vol. 594, n° 2, p. 295-306, janv. 2016, doi: 10.1113/JP271347.
- [277] A. B. Zhainazarov, « Ca²⁺ -activated nonselective cation channels in rat neonatal atrial myocytes », *J. Membr. Biol.*, vol. 193, n° 2, p. 91-98, mai 2003, doi: 10.1007/s00232-002-2010-8.
- [278] C. Simard, T. Hof, Z. Keddache, P. Launay, et R. Guinamard, « The TRPM4 non-selective cation channel contributes to the mammalian atrial action potential », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 59, p. 11-19, juin 2013, doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.019.
- [279] C. Simard *et al.*, « TRPM4 Participates in Aldosterone-Salt-Induced Electrical Atrial Remodeling in Mice », *Cells*, vol. 10, n° 3, mars 2021, doi: 10.3390/cells10030636.

- [280] M.-J. Son *et al.*, « Shear stress activates monovalent cation channel transient receptor potential melastatin subfamily 4 in rat atrial myocytes via type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and Ca(2+) release », *J. Physiol.*, vol. 594, n° 11, p. 2985-3004, juin 2016, doi: 10.1113/JP270887.
- [281] C. Simard *et al.*, « TRPM4 non-selective cation channel in human atrial fibroblast growth », *Pflugers Arch.*, vol. 472, n° 12, p. 1719-1732, déc. 2020, doi: 10.1007/s00424-020-02476-0.
- [282] L. C. Ozhathil, J.-S. Rougier, P. Arullampalam, M. C. Essers, D. Ross-Kaschitza, et H. Abriel, « Deletion of Trpm4 Alters the Function of the Nav1.5 Channel in Murine Cardiac Myocytes », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n° 7, p. 3401, mars 2021, doi: 10.3390/ijms22073401.
- [283] W. Frede *et al.*, « TRPM4 Modulates Right Ventricular Remodeling Under Pressure Load Accompanied With Decreased Expression Level », *J. Card. Fail.*, vol. 26, n° 7, p. 599-609, juill. 2020, doi: 10.1016/j.cardfail.2020.02.006.
- [284] I. Mathar *et al.*, « Increased β -adrenergic inotropy in ventricular myocardium from Trpm4^{-/-} mice », *Circ. Res.*, vol. 114, n° 2, p. 283-294, janv. 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302835.
- [285] N. Syam *et al.*, « Variants of Transient Receptor Potential Melastatin Member 4 in Childhood Atrioventricular Block », *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 5, n° 5, p. e001625, doi: 10.1161/JAHA.114.001625.
- [286] H. Liu *et al.*, « Molecular genetics and functional anomalies in a series of 248 Brugada cases with 11 mutations in the TRPM4 channel », *PLoS One*, vol. 8, n° 1, p. e54131, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0054131.
- [287] F. Gualandi *et al.*, « Mutation Load of Multiple Ion Channel Gene Mutations in Brugada Syndrome », *Cardiology*, vol. 137, n° 4, p. 256-260, 2017, doi: 10.1159/000471792.
- [288] T. Hof *et al.*, « TRPM4 non-selective cation channel variants in long QT syndrome », *BMC Med. Genet.*, vol. 18, n° 1, p. 31, mars 2017, doi: 10.1186/s12881-017-0397-4.
- [289] R. Guinamard et P. Bois, « Involvement of transient receptor potential proteins in cardiac hypertrophy », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1772, n° 8, p. 885-894, août 2007, doi: 10.1016/j.bbadis.2007.02.007.
- [290] H. Watanabe, K. Iino, T. Ohba, et H. Ito, « Possible involvement of TRP channels in cardiac hypertrophy and arrhythmia », *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 13, n° 3, p. 283-294, 2013, doi: 10.2174/1568026611313030006.
- [291] M. Gueffier *et al.*, « The TRPM4 channel is functionally important for the beneficial cardiac remodeling induced by endurance training », *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 38, n° 1, p. 3-16, févr. 2017, doi: 10.1007/s10974-017-9466-8.
- [292] Y. Guo *et al.*, « The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is a positive regulator of pressure overload-induced cardiac hypertrophy », *eLife*, vol. 10, p. e66582, juin 2021, doi: 10.7554/eLife.66582.

- [293] M. Kecskés *et al.*, « The Ca(2+)-activated cation channel TRPM4 is a negative regulator of angiotensin II-induced cardiac hypertrophy », *Basic Res. Cardiol.*, vol. 110, n° 4, p. 43, 2015, doi: 10.1007/s00395-015-0501-x.
- [294] C. Simard, L. Sallé, R. Rouet, et R. Guinamard, « Transient receptor potential melastatin 4 inhibitor 9-phenanthrol abolishes arrhythmias induced by hypoxia and re-oxygenation in mouse ventricle », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 165, n° 7, p. 2354-2364, avr. 2012, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01715.x.
- [295] J. Wang, K. Takahashi, H. Piao, P. Qu, et K. Naruse, « 9-Phenanthrol, a TRPM4 Inhibitor, Protects Isolated Rat Hearts from Ischemia–Reperfusion Injury », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 7, p. e70587, juill. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0070587.
- [296] H. Piao, K. Takahashi, Y. Yamaguchi, C. Wang, K. Liu, et K. Naruse, « Transient Receptor Potential Melastatin-4 Is Involved in Hypoxia-Reoxygenation Injury in the Cardiomyocytes », *PLOS ONE*, vol. 10, n° 4, p. e0121703, avr. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0121703.
- [297] C. Wang, K. Naruse, et K. Takahashi, « Role of the TRPM4 Channel in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology », *Cells*, vol. 7, n° 6, p. E62, juin 2018, doi: 10.3390/cells7060062.
- [298] R. Vennekens et B. Nilius, « Insights into TRPM4 function, regulation and physiological role », *Handb. Exp. Pharmacol.*, n° 179, p. 269-285, 2007, doi: 10.1007/978-3-540-34891-7_16.
- [299] A. Becerra *et al.*, « Transient receptor potential melastatin 4 inhibition prevents lipopolysaccharide-induced endothelial cell death », *Cardiovasc. Res.*, vol. 91, n° 4, p. 677-684, sept. 2011, doi: 10.1093/cvr/cvr135.
- [300] F. Simon et R. Fernández, « Early lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species production evokes necrotic cell death in human umbilical vein endothelial cells », *J. Hypertens.*, vol. 27, n° 6, p. 1202-1216, juin 2009, doi: 10.1097/HJH.0b013e328329e31c.
- [301] C. Echeverría, I. Montorfano, C. Cabello-Verrugio, R. Armisen, D. Varela, et F. Simon, « Suppression of transient receptor potential melastatin 4 expression promotes conversion of endothelial cells into fibroblasts via transforming growth factor/activin receptor-like kinase 5 pathway », *J. Hypertens.*, vol. 33, n° 5, p. 981-992, mai 2015, doi: 10.1097/HJH.0000000000000496.
- [302] W. Sun *et al.*, « A Transcriptomic Analysis Reveals Novel Patterns of Gene Expression During 3T3-L1 Adipocyte Differentiation », *Front. Mol. Biosci.*, vol. 7, p. 564339, 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.564339.
- [303] P. Nelson *et al.*, « Transient receptor potential melastatin 4 channel controls calcium signals and dental follicle stem cell differentiation », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 31, n° 1, p. 167-177, janv. 2013, doi: 10.1002/stem.1264.
- [304] G. Barbet *et al.*, « The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells », *Nat. Immunol.*, vol. 9, n° 10, p. 1148-1156, oct. 2008, doi: 10.1038/ni.1648.

- [305] R. Medert *et al.*, « Genetic background influences expression and function of the cation channel TRPM4 in the mouse heart », *Basic Res. Cardiol.*, vol. 115, n° 6, p. 70, nov. 2020, doi: 10.1007/s00395-020-00831-x.
- [306] G. Jacobs *et al.*, « Enhanced β -adrenergic cardiac reserve in *Trpm4*^{-/-} mice with ischaemic heart failure », *Cardiovasc. Res.*, vol. 105, n° 3, p. 330-339, mars 2015, doi: 10.1093/cvr/cvv009.
- [307] I. Mathar *et al.*, « Increased catecholamine secretion contributes to hypertension in TRPM4-deficient mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 120, n° 9, p. 3267-3279, sept. 2010, doi: 10.1172/JCI41348.
- [308] M. Bogdanova *et al.*, « Models and Techniques to Study Aortic Valve Calcification in Vitro, ex Vivo and in Vivo. An Overview », *Front. Pharmacol.*, vol. 13, p. 835825, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.835825.
- [309] N. Donis *et al.*, « Differential Biological Effects of Dietary Lipids and Irradiation on the Aorta, Aortic Valve, and the Mitral Valve », *Front. Cardiovasc. Med.*, vol. 9, p. 839720, 2022, doi: 10.3389/fcvm.2022.839720.
- [310] G. Rucher, « Imagerie moléculaire des lésions d'athérosclérose vasculaires et valvulaires chez la souris », Thèse de doctorat, Université de Caen Normandie, Caen, 2019.
- [311] P. Bankhead *et al.*, « QuPath: Open source software for digital pathology image analysis », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 16878, déc. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.
- [312] C.-Y. Chen, « Patch Clamp Technique and Applications », in *Modern Tools of Biophysics*, T. Jue, Éd. New York, NY: Springer New York, 2017, p. 49-64. doi: 10.1007/978-1-4939-6713-1_3.
- [313] T. Sordel, « Conception et validation d'une « puce patch-clamp » en silicium pour paralléliser et automatiser les mesures électriques sur cellules individualisées. », *undefined*, 2006, Consulté le: 6 octobre 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.semanticscholar.org/paper/Conception-et-validation-d%27une-%C2%AB-puce-patch-clamp-%C2%BB-Sordel/fc3ce5e5e784794451ecb1b7e2eb8e0cea863f74>
- [314] P. Xu *et al.*, « Radiation-induced dysfunction of energy metabolism in the heart results in the fibrosis of cardiac tissues », *Mol. Med. Rep.*, vol. 24, n° 6, p. 842, déc. 2021, doi: 10.3892/mmr.2021.12482.
- [315] Z. Wang *et al.*, « Long-Term Cardiac Damage Associated With Abdominal Irradiation in Mice », *Front. Pharmacol.*, vol. 13, p. 850735, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.850735.
- [316] A. D. Dreyfuss *et al.*, « A Novel Mouse Model of Radiation-Induced Cardiac Injury Reveals Biological and Radiological Biomarkers of Cardiac Dysfunction with Potential Clinical Relevance », *Clin. Cancer Res.*, vol. 27, n° 8, p. 2266-2276, avr. 2021, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3882.
- [317] G. M. Walls *et al.*, « Murine models of radiation cardiotoxicity: A systematic review and recommendations for future studies », *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, vol. 173, p. 19-31, mai 2022, doi: 10.1016/j.radonc.2022.04.030.

- [318] M. Sárközy *et al.*, « Pathomechanisms and therapeutic opportunities in radiation-induced heart disease: from bench to bedside », *Clin. Res. Cardiol. Off. J. Ger. Card. Soc.*, vol. 110, n° 4, p. 507-531, avr. 2021, doi: 10.1007/s00392-021-01809-y.
- [319] M. Sárközy *et al.*, « Selective Heart Irradiation Induces Cardiac Overexpression of the Pro-hypertrophic miR-212 », *Front. Oncol.*, vol. 9, p. 598, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00598.
- [320] J. M. Straub, J. New, C. D. Hamilton, C. Lominska, Y. Shnayder, et S. M. Thomas, « Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy », *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 141, n° 11, p. 1985-1994, nov. 2015, doi: 10.1007/s00432-015-1974-6.
- [321] S.-H. Kook, K.-A. Kim, H. Ji, D. Lee, et J.-C. Lee, « Irradiation inhibits the maturation and mineralization of osteoblasts via the activation of Nrf2/HO-1 pathway », *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 410, n° 1, p. 255-266, déc. 2015, doi: 10.1007/s11010-015-2559-z.
- [322] I. Fantozzi, S. Zhang, O. Platoshyn, C. V. Remillard, R. T. Cowling, et J. X.-J. Yuan, « Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery endothelial cells », *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 285, n° 6, p. L1233-1245, déc. 2003, doi: 10.1152/ajplung.00445.2002.
- [323] C.-X. Yu *et al.*, « Transient receptor potential melastatin 4 contributes to early-stage endothelial injury induced by arsenic trioxide », *Toxicol. Lett.*, vol. 312, p. 98-108, sept. 2019, doi: 10.1016/j.toxlet.2019.04.035.
- [324] A. I. Sagredo *et al.*, « TRPM4 channel is involved in regulating epithelial to mesenchymal transition, migration, and invasion of prostate cancer cell lines », *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, n° 3, p. 2037-2050, mars 2019, doi: 10.1002/jcp.27371.
- [325] J. S. Swaney, D. M. Roth, E. R. Olson, J. E. Naugle, J. G. Meszaros, et P. A. Insel, « Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 2, p. 437-442, janv. 2005, doi: 10.1073/pnas.0408704102.
- [326] J. Feng *et al.*, « Upregulation of transient receptor potential melastatin 4 (TRPM4) in ventricular fibroblasts from heart failure patients », *Pflugers Arch.*, vol. 473, n° 3, p. 521-531, mars 2021, doi: 10.1007/s00424-021-02525-2.
- [327] B. F. Stewart *et al.*, « Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 29, n° 3, p. 630-634, mars 1997, doi: 10.1016/s0735-1097(96)00563-3.
- [328] A. K. Mitra, R. K. Singh, et M. Krishna, « MAP kinases: differential activation following in vivo and ex vivo irradiation », *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 294, n° 1-2, p. 65-72, janv. 2007, doi: 10.1007/s11010-006-9246-z.
- [329] J. Weisell *et al.*, « Characterizing valve dynamics in mice by high-resolution cine-MRI », *NMR Biomed.*, vol. 32, n° 8, p. e4108, 2019, doi: <https://doi.org/10.1002/nbm.4108>.

ANNEXE

VIII.ANNEXE

Au cours de cette thèse, en plus de l'article publié dans *Cancers*, nous avons valorisé ce travail par la participation à différents congrès et journées scientifiques :

➤ Poster

- **Mpweme et al.** Implication du canal TRPM4 dans le remodelage radio-induit de la valve aortique dans un modèle in vivo ; 14^{èmes} journées scientifiques du cancéropôle Nord-Ouest 05/2022 ; Deauville, France. **Voir page 161.**

➤ Résumés de congrès publiés

- **Mpweme et al.** TRPM4 in radiation-induced aortic valve remodeling in mice; Printemps de la cardiologie 06-07/2022; Tours, France. **Voir page 162.**
- **Aize et al.** Implication of the TRPM4 ion channel in osteogenic differentiation of human valvular interstitial cells Printemps de la cardiologie 06-07/2022 ; Tours, France. **Voir page 163.**

➤ Poster commenté à un congrès international

- **Mpweme et al.** Transient Receptor Potential Melastatin-4 (TRPM4) in irradiation-induced cardiac remodeling; The 4th International TRP Meeting 09/2021; Leuven, Belgique. **Voir page 164.**

➤ Présentations orales

- **Mpweme et al.** TRPM4 in radiation-induced aortic valve remodeling in mice. Journée Normande de la Recherche en Biologie 06/2022 ; Rouen, France. **Voir page 164.**

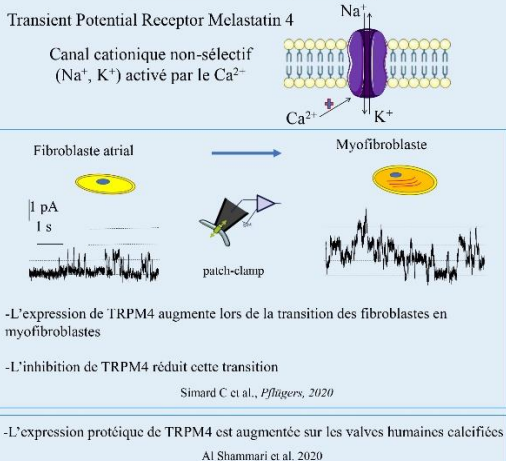
Implication du canal cationique TRPM4 dans le remodelage valvulaire cardiaque radio-induit

Harlyne MPWEME BANGANDO, Christophe SIMARD, Margaux AIZE, Alexandre LEBRUN, Alain MANRIQUE, Romain GUINAMARD
UR 4650, Physiopathologie et Stratégies d'Imagerie du Remodelage cardiovasculaire (PSIR), GIP cyceron, Université de Caen Normandie, Caen, France

INTRODUCTION

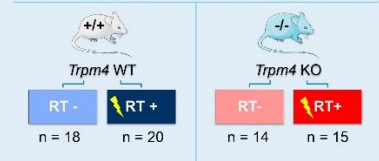
La radiothérapie thoracique peut entraîner dans certains cas un remodelage cardiaque à long terme. Selon les études, jusqu'à 12 % des patientes traitées par radiothérapie pour le cancer du sein développent un dysfonctionnement valvulaire à type de régurgitation ou de sténose. Ce phénomène peut affecter les valves aortiques et mitrales et se manifeste essentiellement par une fibrose tardivement associée à une minéralisation. L'irradiation modifierait l'homéostasie calcique ainsi que l'activité ou le développement des fibroblastes, bien que les acteurs moléculaires impliqués dans ce processus restent inconnus. Le canal cationique monovalent non sélectif TRPM4 est connu pour son implication dans l'homéostasie du calcium dans différents types cellulaires où il module le gradient électrochimique permettant l'entrée du Ca^{2+} et/ou produit une dépolarisation de la membrane cellulaire favorisant ainsi l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants. En outre, il a été démontré qu'il participe à la transition des fibroblastes auriculaires humains en myofibroblastes, un phénomène présentant des similitudes avec ceux observés au cours de la sténose de la valve aortique. De plus, le canal TRPM4 est fortement exprimé dans le tissu cardiaque où il est impliqué dans le remodelage. Il pourrait donc participer au remodelage valvulaire radio-induit. Notre étude vise à évaluer l'implication du canal TRPM4 dans le remodelage valvulaire radio-induit chez la souris.

TRPM4 et remodelage cardiaque



MATERIELS ET METHODES

Souris mâles C57Bl/6J de 4 mois

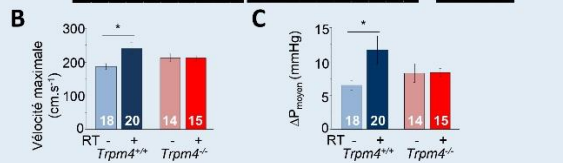
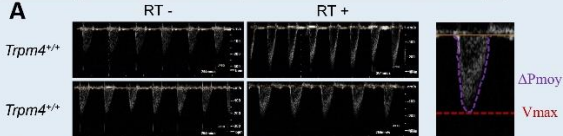


Irradiation de la valve aortique

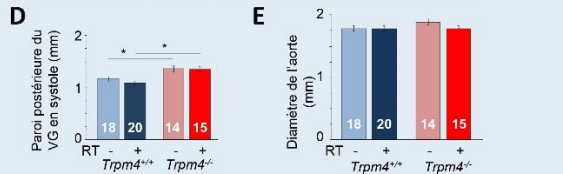


RESULTATS

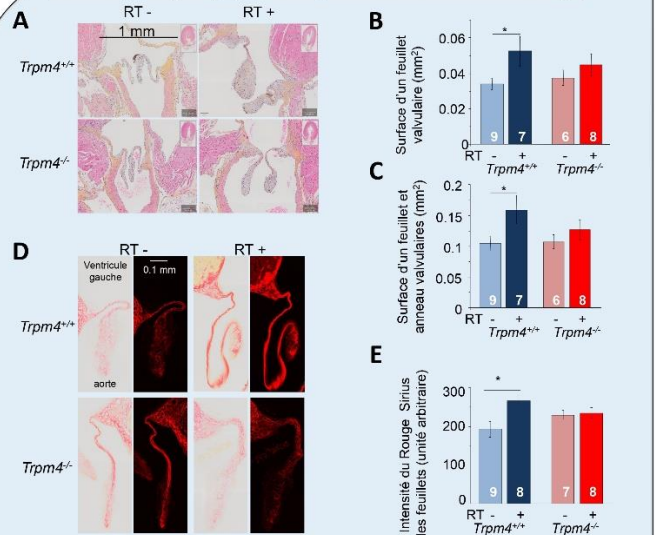
Remodelage fonctionnel 5 mois après irradiation de la valve aortique



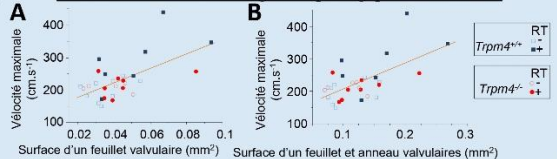
Paramètres cardiaque après irradiation de la valve aortique



Remodelage morphologique 5 mois après irradiation de la valve aortique



Relation entre les remodelages morphologique et fonctionnel



A: Corrélation entre la vitesse maximale et la surface d'un feuillet.
B: Corrélation entre la vitesse maximale et la surface d'un feuillet et anneau.

A: Coupe histologique de la valve aortique, coloration Hématoxyline Eosine Safran.
B: Surface d'un feuillet de la valve en coupe longitudinale.
C: Surface d'un feuillet et de l'anneau de la valve en coupe longitudinale.
D: Coupe histologique de la valve aortique, coloration au Rouge Sirius.
E: Quantification de l'intensité de rouge sur les feuillets de la valve aortique en coupe longitudinale.

CONCLUSION

Ces résultats indiquent que le canal TRPM4 favorise le remodelage valvulaire induit par l'irradiation caractérisé par une fibrose valvulaire. Ainsi, TRPM4 pourrait être une cible pour prévenir les effets secondaires cardiaques de la radiothérapie thoracique et pourrait être impliqué dans le développement de la sténose aortique.

position of the great arteries corrected by atrial switch) commonly develops significant systemic tricuspid valve regurgitation and systemic right ventricular dysfunction in adulthood, both of which being a therapeutic dilemma for the care team. Until recently, the only therapeutic option has been surgery but the rate of complications is high. Percutaneous edge to edge repair could be an alternative, especially for high-surgical risk patients.

Objective To describe clinical and paraclinical follow up of high-surgical risk patients with SRV and severe TR undergoing PETER.

Method 10 high-risk surgical patients with severe systemic tricuspid regurgitation (TR) undergoing a percutaneous repair with the Mitraclip or Triclip system (Abbott) were included between May 2019 and October 2021. We collected and compared clinical (symptoms, quality of life questionnaires), biological (renal function, BNP/ntproBNP levels), VO2 max testing, echocardiographic, and cross-sectional imaging (tricuspid regurgitation severity, right ventricle dilatation and dysfunction) data at baseline and 6 months after the procedure.

Results We report a percutaneous implant success of 80%, one early death due to septal leaflet tear and 2 early common flutter successfully ablated. Clinically, we describe a median improvement after 6 months of functional status as well as physical (+10,3 points) and mental (+12,2 points) quality of life scores. Biologically, BNP and ntproBNP median blood levels decreased (respectively of 162 and 178 $\mu\text{mol/L}$). VO2 max testing parameters did not change significantly. TTE TR severity parameters EROA and regurgitation volume improved of respectively 20 mm^2 and 11 mL while MRI or TDM SRV volumes decreased in median of 25 ml/m^2 for diastolic and 22 ml/m^2 for systolic volume, with an increase in RVEF of 18,5%.

Conclusion Percutaneous edge to edge repair of systemic tricuspid regurgitation might be a safe and effective therapeutic option in high-risk surgical adult patients.

Disclosure of interest The authors declare that they have no competing interest.

<https://doi.org/10.1016/j.acvdsp.2022.04.094>

071

TRPM4 in radiation-induced aortic valve remodeling

Hartyne Mpweme Bangando^{1,*}, Christophe Simard², Margaux Aize¹, Alexandre Lebrun¹, Alain Manrique¹, Romain Guinamard¹

¹ *Ur 4650, physiopathologie et stratégies du remodelage cardiovasculaire (psir), Université de Caen Normandie, Caen, France*

² *Gip cycecon, Normandie Université, Caen, France*

* *Corresponding author.*

E-mail address: hartyne.mpweme-bangando@unicaen.fr (H.M. Bangando)

Introduction Thoracic radiation therapy may lead to unexpected cardiac remodeling, and up to 12% of patients treated with radiotherapy for breast cancer develop valvular dysfunction including regurgitation and stenosis. This phenomenon can affect both aortic and mitral valves and involve fibrosis and calcification. It is suspected that irradiation modify Ca^{2+} handling as well as fibroblast activity or development, but molecular determinants remain unknown.

The monovalent non-selective cation channel TRPM4 is known to be involved in calcium handling since it modulates driving force for Ca^{2+} entry and produced cell depolarization potentiating voltage-gated Ca^{2+} channels opening. It also participates in human atrial fibroblast transition to myofibroblast, a phenomenon with similarities to those observed during aortic valve stenosis. This channel exhibits a high expression in cardiac tissue and is involved in cardiac remodeling.

Objective Our aim was to evaluate the participation of TRPM4 in radiation-induced valvular damages.

Method In order to achieve this aim we developed a model of 4 months Trpm4^{+/+} and Trpm4^{-/-} mouse submitted to 10Gy irradiation at the aortic valve. Cardiac parameters were evaluated by echography measurements at 5 months post-irradiation. At that time, mice were euthanized and hearts collected for histological assessments.

Results In control conditions Trpm4^{-/-} mice exhibited a left ventricular hypertrophy compared to Trpm4^{+/+}, as previously reported in this model, but maximal velocity of aortic jet (Vmax) was similar in Trpm4^{+/+} and Trpm4^{-/-} mice. Five month after irradiation, Trpm4^{+/+} mice developed a significant 30% increase in Vmax as well as an increase in maximal and mean pressure gradient, while no significant variation was detected in Trpm4^{-/-} animals. Trpm4^{+/+} irradiated mice have shown a significant 48% increase of the surface of aortic valve leaflets compare to Trpm4^{+/+} control mice while no significant variation were observed in Trpm4^{-/-} animals.

Conclusion These results indicate that TRPM4 promote radiation-induced valvular remodelling. Thus TRPM4 might be regarded as a target to prevent cardiac side effects in chest radiotherapy and might be involved in aortic stenosis development.

This work was supported by a grant ANR-16-RHUS-0003 and conducted as part of the FHU CARNAVAL project.

Disclosure of interest The authors declare that they have no competing interest.

<https://doi.org/10.1016/j.acvdsp.2022.04.095>

116

Partial anomalous pulmonary venous return in adults. Insight into pulmonary hypertension

Nour Rahnama^{1,*}, Benoît Ghaye², Linda Kubangumusu³, Agnès Pasquet¹, Alain Poncelet⁴, Joelle Kefer¹, Stéphane Moniotte⁵, Geoffroy De Beco⁴, Sophie Pierard¹

¹ *Cardiologie, Cliniques universitaires Saint-Luc (UCLouvain), Bruxelles, Belgique*

² *Radiologie, Cliniques universitaires Saint-Luc (UCLouvain), Bruxelles, Belgique*

³ *Cardiologie, Cliniques de l'Europe de Bruxelles, Uccle, Belgique*

⁴ *Chirurgie cardiaque, Cliniques universitaires Saint-Luc (UCLouvain), Bruxelles, Belgique*

⁵ *Cardiopédiatrie, Cliniques universitaires Saint-Luc (UCLouvain), Bruxelles, Belgique*

* *Corresponding author.*

E-mail address: nour.rahnama@uclouvain.be (N. Rahnama)

Introduction Partial anomalous pulmonary venous return (PAPVR) is a rare congenital heart disease (CHD) where pulmonary veins drain into pulmonary circulation leading to a left-to-right shunt. PAPVR can lead to serious consequences, ie pulmonary hypertension (PH). To date, predictors of PH are not well established.

Objective The aims of this study were (1) to determine the prevalence of PAPVR (2) to identify the impact of PAPVR on the right ventricle, (3) to determine the prevalence of PH in the PAPVR population and to identify its predictive factors.

Method Patients aged ≥ 18 years with a non-operated PAPVR and patients operated after the age of 18 were enrolled. Patients with other potential causes of PH were excluded. PH was defined based on right heart catheterization (RHC). For patients without RHC, PH was considered when echocardiographic systolic transtricuspid peak velocity was $\geq 3.4 \text{ m/s}$.

Results Fifty patients were included. Mean patient age was 50 ± 18 years with a 60% female predominance. PAPVR was mostly arising from the right lung (76% of cases) and was associated with CHD in 18 patients (36%). Most of them (83%) were sinus venosus atrial septal defect (ASD). PAPVR was diagnosed by chest computed

tomography (CT) in 37 patients (74%). The reported prevalence of PAPVR was 0.2% (23/13606 chest CT reports). PH was identified in 7 patients of the cohort (14%) and 2 of them had Eisenmenger syndrome. All the echocardiographic parameters of RV dimensions were increased. PH group compared to group without PH had a decreased RV FAC ($35 \pm 13\%$ vs $43 \pm 10\%$, $P=0.049$), a decreased RV endoGLS ($-18 \pm 5\%$ vs $-23 \pm 4\%$, $P=0.01$) and a significantly higher Qp/Qs ratio ($2.2 [1.5;3.0]$ vs $1.1 [1.0;1.4]$, $P=0.013$). Qp/Qs ratio was the only significant predictive factor for PH (OR=4.87; $P=0.025$), with an AUC of 0.87 ($P=0.016$) and the optimal threshold value was 1.95. **Conclusion** Prevalence of PAPVR is 0.2% based on chest CT database. 14% of the patients with PAPVR developed PH and 30% of them had Eisenmenger syndrome. RV function parameters (FAC and endoGLS) were significantly decreased in PH group. Qp/Qs was the only significant predictive factor for PH. **Disclosure of interest** The authors declare that they have no competing interest.

<https://doi.org/10.1016/j.acvdsp.2022.04.096>

150

Implication of TRPM4 ionic channel in osteogenic differentiation of human valvular interstitial cells



Margaux Aize^{1,*}, Harlyne Mpweme Bangando¹, Laura Brard¹, Nicolas Perzo², Romain Guinamard¹, Christophe Simard¹
¹ Normandie Université, UR4650, PSIR, Cyceron, Caen, France
² INSERM u1239, dc2n, institute for research and innovation in biomedicine (irib), UNIROUEN, Rouen, France

* Corresponding author.

E-mail address: margaux.aize@unicaen.fr (M. Aize)

Introduction The Ca²⁺-activated non selective cationic channel, TRPM4, is involved in cardiac fibroblasts remodelling. In valvular interstitial cells (VIC), with similar properties than fibroblasts, its expression at the mRNA level was reported to be higher in conditions of valvular calcification leading to aortic stenosis. Endothelial dysfunction, followed by inflammation and fibrosis, promote the differentiation of VIC into osteoblastic phenotype cells which is, at term, responsible of valve ossification.

Objective The purpose of this study is to search for a potential implication of TRPM4 into osteogenic differentiation of human VIC.

Method Human aortic valves are obtained from surgery for valve replacement. VIC are isolated by enzymatic digestion then maintained in culture. VIC are incubated during 14 days in a pro-calcific mixture in the presence or not of 9-phenanthrol, a pharmacological inhibitor of TRPM4. Expression and functionality of this channel were followed respectively by Western Blot and electrophysiological recordings in the inside-out configuration of the patch clamp technique. The implication of TRPM4 in VIC mineralization process was observed by measuring calcific crystals using alizarin red staining.

Results A typical TRPM4 single channel current was detected in VIC in culture with a single channel conductance of 20 pS, a monovalent cationic permeability as well as voltage and calcium sensitivity. Protein expression of TRPM4 was confirmed by Western Blot. Pharmacological inhibition of the channel by 9-phenanthrol (3.10–6 M), during culture, reduced the mineralization by 30% without affecting cell viability.

Conclusion Thereby, TRPM4 would participate in osteogenic differentiation of human VIC in culture. Further studies are needed to understand which mechanisms link TRPM4 and osteogenic differentiation.

Disclosure of interest The authors declare that they have no competing interest.

<https://doi.org/10.1016/j.acvdsp.2022.04.097>

160

Impact of 2021 ESC/EACTS surgical triggers on postoperative survival in aortic regurgitation: Insights from the AVIATOR registry



Vincent Hanet^{1,*}, David De Azevedo¹, Pauline Krug¹, Alexandre Altes², Hans-Joachim Schäfers³, Emmanuel Lansac⁴, Ismail El Hamamsy⁵, Jan Vojáček⁶, Monica Contino⁷, Anne-Catherine Pouleur¹, Christophe Beauloye¹, Agnès Pasquet¹, Jean-Louis Vanoverschelde¹, David Vancraeynest¹, Bernhard Gerber¹

¹ Cardiologie, Cliniques universitaires Saint-Luc (UCLouvain), Bruxelles, Belgique

² Cardiologie, Hôpital Saint Philibert, Lille, France

³ Chirurgie cardiaque, Cliniques universitaires de la Sarre, Homburg, Allemagne

⁴ Chirurgie cardiaque, L'Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France

⁵ Chirurgie cardiaque, Institut de cardiologie de Montréal, Montréal, Canada

⁶ Chirurgie cardiaque, Charles University Hospital, Hradec Králové, République Tchèque

⁷ Chirurgie cardiaque, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Fatebenefratelli Sacco, Università degli studi di Milano, Milan, Italie

* Corresponding author.

E-mail address: vincenthanet@gmail.com (V. Hanet)

Introduction Until 2021, the strongest guidelines on surgical correction of severe aortic regurgitation (AR) focused on the left ventricular systolic function (LVEF) and the presence of symptoms. However, those situations lead to an outcome penalty, even after surgical correction. Recommendations on left ventricular end-systolic diameter (LVESD) gained in strength in 2021 as ESC/EACTS guidelines upgraded them for a class I. Moreover, more inclusive threshold values are now recommended as a class IIb for patients at low surgical risk, reflecting the will to recommend surgery before developing heart failure and its consequences on post-operative outcome.

Objective We sought to evaluate the impact of each guideline trigger and their new threshold on postoperative survival in chronic and severe AR from a large multicentric international registry.

Method AVIATOR is an international multicenter surgery registry for aortic valve surgery. We selected adult patients which were operated with a severe and chronic AR. Final study population was 1899 patients (49 ± 15 years, 85% male) in which 1443 (76%) had symptoms (NYHA > I), 494 (26%) had a reduced LVEF ($\leq 50\%$) and 549 (29%) had a dilated left ventricle (LVESD > 50 mm or > 25 mm/m²). Postoperative overall survival was evaluated over a median of 37 months and censored at 10 years to limit bias from possible reoperation.

Results Twelve patients (0.6%) died postoperatively, and 68 within 10 years. By multivariable Cox analysis, presence of heart failure symptoms (HR 2.60; 95CI [1.20–5.66]; $P=0.016$), and either LVESD > 50 mm or > 25 mm/m² (HR 1.64; 95%CI [1.05–2.55]; $P=0.029$) predicted survival independently over and above age, female gender and bicuspid phenotype. Therefore, patients operated on when meeting class I trigger had worse survival ($87 \pm 2\%$) than patients operated on without meeting trigger ($97 \pm 2\%$, $P < 0.01$). However asymptomatic patients operated on when meeting new class IIb trigger (LVESD > 20 mm/m² or LVEF between 50–55%) had an excellent 10-year survival ($97 \pm 3\%$) (Fig. 1).

Conclusion In severe AR, patients operated on when meeting class I triggers have postoperative survival penalty. Asymptomatic patients operated on earlier have better survival. This supports early surgery in AR as encouraged by the recent ESC/EACTS guidelines.

Transient Receptor Potentiel Melastatin-4 (TRPM4) in irradiation-induced cardiac remodeling

Harlyne Mpweme, Christophe Simard, Margaux Aize, Alain Manrique, Romain Guinamard

Normandie Université, Groupe Signalisation, électrophysiologie et imagerie des lésions d'ischémie-reperfusion myocardique
SEILIRM-EA4650

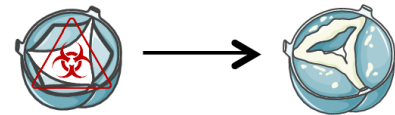
Introduction

Radiotherapy



- Pericarditis
- Cardiomyopathy
- Coronary artery disease
- Conduction system abnormality
- Valvular heart disease 12%

↓
Aortic valve stenosis



Wang et al IJBS 2019
Kostyunin et al , J Mol cell Cardiol. 2019

Effet de la suppression du canal TRPM4 sur le remodelage radio-induit de la valve aortique chez la souris

Harlyne Mpweme Bangando, Christophe Simard, Margaux Aize, Alexandre Lebrun, Alain Manrique, Romain Guinamard

Laboratoire : Physiopathologie et Stratégies d'Imagerie du Remodelage cardiovasculaire.
PSIR-UR4650, Unicaen

RESUME-ABSTRACT

RESUME

Implication du canal cationique TRPM4 dans le remodelage radio-induit de la valve aortique

La radiothérapie thoracique peut entraîner un remodelage cardiaque inattendu. Certains patients traités par radiothérapie pour le cancer du sein ou le lymphome de Hodgkin peuvent développer des valvulopathies telles qu'une régurgitation et une sténose. Ce processus implique le développement d'une fibrose suivie d'une calcification de la valve, mais les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués sont peu connus. Le canal cationique non sélectif TRPM4 participe à la transition des fibroblastes atriaux humains en myofibroblastes. Un phénomène présentant des similitudes avec ceux observés lors de la sténose aortique suggérant sa possible implication dans cette sténose. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'implication du canal TRPM4 dans le remodelage radio-induit de la valve aortique.

Pour répondre à cette question, nous avons développé un modèle *in-vivo* de souris *Trpm4^{+/+}* et *Trpm4^{-/-}* de 4 mois soumises à une irradiation de 10 Gy au niveau de la valve aortique. Les paramètres cardiaques ont été évalués par échographie et IRM à 5 mois après l'irradiation. Par la suite les cœurs ont été collectés pour des analyses morphologiques et histologiques.

Cinq mois après l'irradiation, les souris *Trpm4^{+/+}* présentaient une augmentation de la vitesse maximale du flux aortique ainsi que du gradient de pression moyen transvalvulaire, alors qu'aucune variation significative n'a été détectée chez les animaux *Trpm4^{-/-}*. L'analyse morphologique des valves a montré que les souris *Trpm4^{+/+}* irradiées présentaient une surface des feuillets valvulaires plus importante que les souris témoins *Trpm4^{+/+}* et le marquage du collagène a révélé une fibrose, alors qu'aucune variation significative n'a été observée chez les animaux *Trpm4^{-/-}*. Parmi les acteurs cellulaires potentiels, nous avons observé que le canal TRPM4 est présent et fonctionnel dans les cellules interstitielles valvulaires humaines.

Ces résultats indiquent que TRPM4 favorise le remodelage valvulaire induit par les rayonnements ionisants. Il pourrait ainsi être une cible pour prévenir les effets secondaires cardiaques de la radiothérapie thoracique. Plus généralement, il pourrait être impliqué dans le développement de la sténose aortique.

ABSTRACT

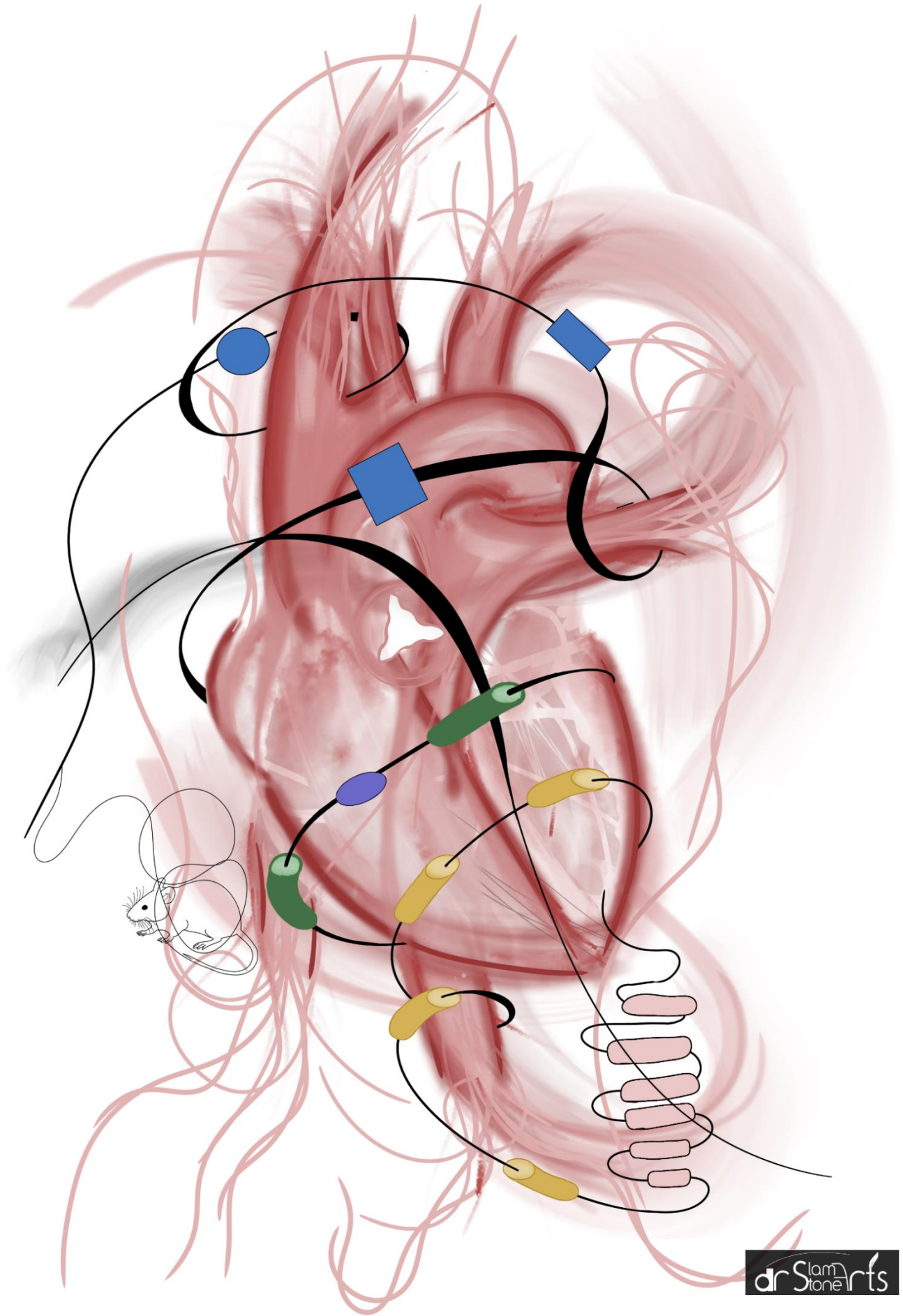
TRPM4 in irradiation-induced aortic valve remodeling

Thoracic radiation therapy may lead to unexpected cardiac remodelling. Some patients treated with radiotherapy for breast cancer or Hodgkin's lymphoma might develop valvular dysfunction including regurgitation and stenosis. This process involves the development of fibrosis followed by valvular calcification, but the cellular and molecular determinants involved are poorly understood. The non-selective cation channel TRPM4 participates in human atrial fibroblast transition to myofibroblast, a phenomenon with similarities to those observed during aortic valve stenosis, suggesting its potential involvement in that stenosis. Our aim was to evaluate TRPM4 implication in radiation-induced valvular damages.

To answer this question, we developed an *in-vivo* model of 4 months *Trpm4*^{+/+} and *Trpm4*^{-/-} mouse submitted to 10 Gy irradiation at the aortic valve. Cardiac parameters were evaluated by echography and MRI measurements at 5-months post irradiation. At that time, hearts were collected for morphological and histological assessments.

Five months after irradiation, *Trpm4*^{+/+} mice developed an increase in maximal aortic jet velocity and mean transvalvular pressure gradient, while no significant variation was detected in *Trpm4*^{-/-} animals. Morphological analysis showed that *Trpm4*^{+/+} irradiated mice exhibited a significant increase of the aortic valve leaflets surface compared to *Trpm4*^{+/+} control mice and collagen staining revealed signs of fibrosis while no significant variation was observed in *Trpm4*^{-/-} animals. Among potential cellular actors, we demonstrated that human valvular interstitial cells express functional TRPM4 channels.

These results indicate that TRPM4 promotes radiation-induced valvular remodelling. It thus might be a target to prevent cardiac side effects in chest radiotherapy. It might also be involved in aortic stenosis development.



Implication du canal cationique TRPM4 dans le remodelage radio-induit de la valve aortique

La radiothérapie thoracique peut entraîner un remodelage cardiaque inattendu. Certains patients traités par radiothérapie pour le cancer du sein ou le lymphome de Hodgkin peuvent développer des valvulopathies telles qu'une régurgitation et une sténose. Ce processus implique le développement d'une fibrose suivie d'une calcification de la valve, mais les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués sont peu connus. Le canal cationique non sélectif TRPM4 participe à la transition des fibroblastes atriaux humains en myofibroblastes. Un phénomène présentant des similitudes avec ceux observés lors de la sténose aortique suggérant sa possible implication dans cette sténose. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'implication du canal TRPM4 dans le remodelage radio-induit de la valve aortique.

Pour répondre à cette question, nous avons développé un modèle *in-vivo* de souris *Trpm4^{+/+}* et *Trpm4^{-/-}* de 4 mois soumises à une irradiation de 10 Gy au niveau de la valve aortique. Les paramètres cardiaques ont été évalués par échographie et IRM à 5 mois après l'irradiation. Par la suite les cœurs ont été collectés pour des analyses morphologiques et histologiques.

Cinq mois après l'irradiation, les souris *Trpm4^{+/+}* présentaient une augmentation de la vélocité maximale du flux aortique ainsi que du gradient de pression moyen transvalvulaire, alors qu'aucune variation significative n'a été détectée chez les animaux *Trpm4^{-/-}*. L'analyse morphologique des valves a montré que les souris *Trpm4^{+/+}* irradiées présentaient une surface des feuillets valvulaires plus importante que les souris témoins *Trpm4^{+/+}* et le marquage du collagène a révélé une fibrose, alors qu'aucune variation significative n'a été observée chez les animaux *Trpm4^{-/-}*. Parmi les acteurs cellulaires potentiels, nous avons observé que le canal TRPM4 est présent et fonctionnel dans les cellules interstitielles valvulaires humaines.

Ces résultats indiquent que TRPM4 favorise le remodelage valvulaire induit par les rayonnements ionisants. Il pourrait ainsi être une cible pour prévenir les effets secondaires cardiaques de la radiothérapie thoracique. Plus généralement, il pourrait être impliqué dans le développement de la sténose aortique.

TRPM4 in irradiation-induced aortic valve remodeling

Thoracic radiation therapy may lead to unexpected cardiac remodelling. Some patients treated with radiotherapy for breast cancer or Hodgkin's lymphoma might develop valvular dysfunction including regurgitation and stenosis. This process involves the development of fibrosis followed by valvular calcification, but the cellular and molecular determinants involved are poorly understood. The non-selective cation channel TRPM4 participates in human atrial fibroblast transition to myofibroblast, a phenomenon with similarities to those observed during aortic valve stenosis, suggesting its potential involvement in that stenosis. Our aim was to evaluate TRPM4 implication in radiation-induced valvular damages.

To answer this question, we developed an *in-vivo* model of 4 months *Trpm4^{+/+}* and *Trpm4^{-/-}* mouse submitted to 10 Gy irradiation at the aortic valve. Cardiac parameters were evaluated by echography and MRI measurements at 5-months post irradiation. At that time, hearts were collected for morphological and histological assessments.

Five months after irradiation, *Trpm4^{+/+}* mice developed an increase in maximal aortic jet velocity and mean transvalvular pressure gradient, while no significant variation was detected in *Trpm4^{-/-}* animals. Morphological analysis showed that *Trpm4^{+/+}* irradiated mice exhibited a significant increase of the aortic valve leaflets surface compared to *Trpm4^{+/+}* control mice and collagen staining revealed signs of fibrosis while no significant variation was observed in *Trpm4^{-/-}* animals. Among potential cellular actors, we demonstrated that human valvular interstitial cells express functional TRPM4 channels.

These results indicate that TRPM4 promotes radiation-induced valvular remodelling. It thus might be a target to prevent cardiac side effects in chest radiotherapy. It might also be involved in aortic stenosis development.