



HAL
open science

Rôle de l'interleukine-8 dans la progression de la calcification valvulaire aortique

Kawthar Dhayni

► **To cite this version:**

Kawthar Dhayni. Rôle de l'interleukine-8 dans la progression de la calcification valvulaire aortique. Médecine humaine et pathologie. Université de Picardie Jules Verne, 2022. Français. NNT : 2022AMIE0090 . tel-04165281

HAL Id: tel-04165281

<https://theses.hal.science/tel-04165281v1>

Submitted on 18 Jul 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.



Thèse de Doctorat

Mention Biologie et Santé

Spécialité maladies vasculaires - remodelage

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

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Kawthar DHAYNI

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

Rôle de l'interleukine-8 dans la progression de la calcification valvulaire aortique

Soutenue le 12 Septembre 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. Kazem ZIBARA, PU
M. Éric DURAND, PU-PH
M^{me} Annabelle DUPONT, PU-PH
M. Hervé KEMPF, CR INSERM
M^{me} Lucie HÉNAUT, Ingénieure de recherche
M. Saïd KAMEL, PU-PH
M. Youssef BENNIS, MCU-PH

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse



Remerciements

En rédigeant mon travail de thèse, je souhaitais adresser tous mes remerciements pour toutes les personnes qui m'ont soutenue tout au long de tout mon chemin.

J'adresse mes remerciements en premier lieu à mon directeur de thèse, Pr. *Saïd KAMEL*, pour m'avoir dirigée tout au long de ces trois années. J'aimerais lui dire que je suis très reconnaissante pour son encouragement, tous ses essais pour me mettre toujours dans les bonnes conditions. Mes sincères remerciements pour son aide inestimable.

Je suis également reconnaissante envers mon directeur de thèse, Dr. *Youssef BENNIS* pour m'avoir fait confiance dès le début, pour son suivi au quotidien, pour sa gentillesse qui a rendu le travail beaucoup plus confortable et pour son précieux temps qu'il a consacré pour me guider dès le premier jour jusqu'à la fin. Je ne le remercierai jamais assez.

Je remercie Pr. *Kazem ZIBARA* pour m'avoir fait découvrir le laboratoire MP3CV et m'avoir donné la chance d'y faire ma thèse, pour ses précieux conseils et sa participation scientifique qui a enrichi ce travail.

Je remercie profondément Dr. *Lucie HÉNAUT* pour son aide sur le plan technique et scientifique, pour ses conseils et son encouragement.

J'exprime ma gratitude au Pr. *Eric DURAND* et Pr. *Annabelle DUPONT* pour s'être intéressés par ce travail et avoir ainsi accepté de le rapporter et de l'enrichir par leurs conseils.

Mes sincères remerciements vont à Dr. *Hervé KEMPF*, Pr. *Kazem ZIBARA* et Dr. *Lucie HÉNAUT* pour leur participation au jury de soutenance. J'apprécie sincèrement leur temps consacré pour ce travail.

Je remercie également Pr. *Michel BRAZIER*, Pr. *Agnès BOULLIER*, Pr. *Romuald MENTAVERRI* et Dr. *Isabelle Six* pour leur multitudes conseils qui ont enrichis mon expérience de recherche dans le laboratoire.

Mes chaleureux remerciements vont également à *Cédric, Gaëlle, Carine, Hakim, Sabrina, Marlène, Loïc et Cathy* pour les connaissances qu'ils m'ont partagée, pour leurs conseils et pour leur belle ambiance familiale au laboratoire.

Dans ces moments je pense particulièrement à *Chantal*, un grand merci pour son aide dans les démarches administratives, les préparations pour les voyages. J'aimerais lui dire à quel point j'apprécie tout ce qu'elle a fait pour moi. Elle est une personne très spéciale. Merci beaucoup pour tout ma très chère *Chantal* !

J'adresse mes chaleureux remerciements aux étudiants qui ont été dans notre laboratoire : *Maria, Linda, Souvik, Ali, Daniel et Shérine* et pour ceux qui sont encore là : *Camille, Iuri, Touria, Isabelle, Aimé, Guillaume, Azrat et Sally*. Merci beaucoup pour la bonne ambiance et les bons moments partagés ensemble.

Je remercie ma chère collaboratrice *Yuthiline*, pour tous les bons moments partagés pendant notre travail ensemble, les astuces chirurgicales qu'elle m'a apprises dans le laboratoire ainsi que les bons moments partagés ensemble en dehors du labo.

I would like to especially thank Nervana. Despite her arrival during just my last few months, she became a close friend in a jiffy. Thanks for all the fun and laughs we had during this last year, for our hangouts, discoveries, as well as the support and friendship that she showed.

Je tiens à remercier Particulièrement *Nadia* qui était ma sœur à l'étranger. Merci pour tous les bons moments partagés ensemble, pour nos discussions, pour son support et son encouragement. Merci du fond du cœur d'être devenu ma famille et mon support à l'étranger.

Je remercie également ma petite famille libanaise en France : *Fatima, Dala, Racha, Manar et Nervana*. Merci pour tous les bons moments inoubliables, pour nos sorties et nos découvertes ensemble.

Then my work would not have come to an end without the support of my fiancé Ali. He was always by my side encouraging my choices during this journey that would have been struggling without him. He believed in me and that was the greatest encouragement. My everything, thanks for being in my life. "Love you".

Je remercie chaleureusement mes sœurs : *Malak, Nour, Zeinab* et mon petit frère *Ali* pour leur amour, leur encouragement et leur soutien.

Dans ces moments je ne peux pas oublier une belle âme qui m'a quittée très tôt mais qui reste le grand support et l'amour pendant toute ma vie. Merci Papa pour ta présence que je ressens toujours. Je n'oublie jamais comment tu nous as encouragé toujours pendant notre enfance, moi et mes sœurs, à aller loin dans nos études. J'espère que tu es aujourd'hui fière de ta fille.

À la fin le plus grand merci pour ma mère, qui était pour nous une mère et un père à la fois, qui a cru en moi et m'a toujours soutenue. Tous les mots ne sont pas suffisants pour te remercier Maman.

Pour Papa et Maman, qui partagent une partie de mon cœur, je dédie cette thèse.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	2
TABLE DES MATIÈRES.....	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES FIGURES.....	13
RÉSUMÉ.....	17
ABSTRACT.....	19
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
<u>1. Le rétrécissement aortique calcifié (RAC).</u>	22
1.1. Épidémiologie, facteurs de risque et aspects cliniques	23
1.2. Diagnostic.....	23
1.3. Biomarqueurs de la sténose valvulaire aortique.....	26
1.4. Traitement pharmacologique.....	28
1.5. Traitement non pharmacologique.....	31
<u>2. Mécanismes physiopathologiques du RAC.</u>	36
2.1. Rappels anatomiques et histologiques de la valve aortique.....	36
2.2. Voies moléculaires de calcification.....	43
2.3. Communication intercellulaire et rôle des vésicules extracellulaires.....	45
2.4. Remodelage de la MEC dans une valve aortique sténotique.....	47
2.5. Étapes du développement du RAC.....	53
<u>3. Interleukine 8 et maladies cardiovasculaires.</u>	58
3.1. Rappel sur les chimiokines.....	58

3.2. Caractéristiques générales de l'interleukine 8.....	59
3.3. Les récepteurs de l'IL-8 : CXCR1 et CXCR2.....	60
3.4. Rôle de l'IL-8 dans les maladies cardiovasculaires.....	65
3.5. Rôle de CXCR1 et CXCR2 dans les maladies cardiovasculaires.....	69
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	73
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	76
<u>1. Modèle cellulaire : hVICs en culture.....</u>	77
1.1. Culture des hVICs.....	77
1.2. Induction de la calcification.....	78
1.3. Test de viabilité cellulaire.....	79
1.4. Coloration au rouge alizarine.....	79
1.5. Dosage du calcium.....	80
1.6. Extraction d'ARNm.....	81
1.7. Transcription inverse.....	81
1.8. Quantitative polymérase chain reaction (qPCR).....	82
1.9. Extraction et quantification de protéines.....	83
1.10. Western blot.....	83
1.11. Cytométrie de flux.....	85
1.12. Sécrétion de MMP12.....	85
1.13. Activité MMP12.....	86
<u>2. Analyse des valves aortiques de patients atteints de RAC.....</u>	86
2.1. Analyse histologique.....	87

2.2. Analyse biochimique: Western blot.....	89
<u>3. Modèle de valves des pores en culture</u>	89
3.1. Dosage du calcium tissulaire.....	90
3.2. Analyse histologique.....	90
3.3. Analyse biochimique: Western blot.....	91
<u>4. Modèle de valves de porc implantées en sous cutané chez le rat</u>	91
4.1. Description du modèle.....	91
4.2. Population de rats.....	92
4.3. Protocole d'implantation.....	92
4.4. Protocole de traitement des rats.....	92
4.5. Dosage du calcium.....	93
4.6. Analyses histochimiques.....	93
4.7. Western blot.....	94
4.8. Numération sanguine.....	94
5. Analyses statistiques	94
RÉSULTATS	95
<u>1. Modèle cellulaire : hVICs en culture</u>	96
1.1. Les récepteurs d'IL-8 (CXCR1/2) sont exprimés par les hVICs.....	96
1.2. L'IL-8 augmente la calcification des hVICs induite par le Pi et cet effet est prévenu par l'ajout de l'antagoniste SCH527123.....	98
1.3. Effets de l'IL-8 sur la modulation des marqueurs ostéogéniques, myofibroblastiques et des métalloprotéases à activité élastase des hVICs.....	101
1.4. Rôle de MMP12 et de l'élastine dans la calcification des hVICs.....	103
1.5. L'IL-8 active la voie de signalisation NFkB par les hVICs.....	104

1.6. Effet de l'inhibition de la voie NFkB sur les effets de l'IL-8.....	105
1.7. Effet de l'IL-8 sur la dégradation de l'élastine	106
<u>2. Analyse des valves aortiques de patients atteints de RAC</u>	108
<u>3. Modèle de valves de porcs en culture</u>	112
<u>4. Modèle de valves de porc implantées en sous cutané chez le rat</u>	114
4.1. Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit la calcification des valves.....	114
4.2. Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit l'hyperleucocytose sanguine	115
4.3. Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit l'infiltration dans les valves de certaines cellules inflammatoires.....	116
DISCUSSION	118
CONCLUSION GÉNÉRALE	131
VALORISATION DU TRAVAIL	134
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	139

LISTE DES ABRÉVIATIONS:

A:

ARA2 : Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine 2
AMP : Adénosine monophosphate cyclique
ATP : Adénosine triphosphate
ADN : Acide désoxyribonucléotidiques
AVA : Aire valvulaire aortique
AVC : Accident vasculaire cérébral
AP-1 : Protéine activatrice-1
AC : Adénylate cyclase
ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACE2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine homologue 2
ALP : Alkaline phosphatase
Ang I : Angiotensine I
Ang (1-7) : Angiotensine (1-7)
Ang II : Angiotensine II
aVICs : Cellules interstitielles de la valve activées
 α SMA : α -smooth muscle actin

B:

BMPs : Bone morphogenic proteins
BNP : Peptide natriurétique de type B

C:

CE : Cellules endothéliales
CRP : Protéine C-réactive
C : Calcifié
Ca²⁺ : Calcium
cAMP : AMP cyclique
CAVS : Calcific aortic valve stenosis
CML : Cellules musculaires lisses
CT-scan : Computed tomography

D:

DV : Dégénérescence valvulaire
DAG : Diacylglycérol

E:

EMT : Transition endothélio-mésenchymateuse
ENPP1 : Ecto-nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 1
Erk : Extracellular signal-regulated kinase

F:

Fet-A : Fétuin-A
KLF15 : Factor Krüppel-like 15
18F-FDG : 18F - Fluorodésoxyglucose
18F-NaF : 18F - Sodium fluoride

G:

GDF-15 : Facteur de différenciation et de croissance-15
GM : Gradient transvalvulaire aortique moyen
GAGs : Glycosaminoglycanes

GRK : G protein-coupled receptor kinases

GA : Glutaraldéhyde

H:

hVICs : Cellules interstitielles de la valve humaine

hASMCs : Human aortic smooth muscle cells

I:

IP : Intrapéritonéale

ICAM-1 : Molécule d'adhésion intercellulaire-1

IEC : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

IP3 : Inositol-1,4,5-trisphosphate

IRC : Insuffisance rénale chronique

K:

KAF : kinase d'adhésion focale

KO : knockdown

L:

LV : Ventricule gauche

Lpa : Lipoprotéine a

LDL : Low density Lipoprotein

M:

MIF : Facteur inhibiteur de migration

MMPs : Métalloprotéinases

miARN : microARN

MAPKs : Mitogen activated protein kinases

MEC : Matrice extracellulaire

MEK : Mitogen-activated protein kinase

MGP : Matrix gla protein

MPCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1

N:

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NC : Non calcifié

NFκB : Nuclear factor kappa B

O:

obVICs : hVICs ostéoblastiques

ox-LDL : Lipoprotéines de basse densité oxydés

OPG : Ostéoprotégérine

OPN : Ostéopontine

OSX : Ostérix

P:

PI3K : Phosphoinositide 3-kinases

pVICs : hVICs progéniteurs

PG : Protéoglycanes

PN : polypeptides natriurétiques

PNC : Peptide natriurétique cérébral

PNA : Peptide natriurétique auriculaire

PET-scan : Positron emission tomography

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

PS : Phosphatidylsérine

PPi : Pyrophosphate

PTH : Parathormone

Q:

qVICs : hVICs quiescentes

R:

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RRP : Récepteur de reconnaissance des formes

RAC : Rétrécissement aortique calcifié

RVA : Remplacement valvulaire aortique

RANK : Receptor activator of nuclear factor KB

RANKL : Receptor activator of nuclear factor KB ligand

RAS : Système rénine angiotensine

Runx2 : Runt-related transcription factor 2

S:

SHR : Rats hypertendus

SAVR : Surgical aortic valve replacement

STAT : Signal transducer and activator of transcription

SVF : Sérum de veau fœtal

SC : Sous cutanée

T:

TEP : Tomographie par émission de positons

TLR : Récepteurs de type toll

TIMPs : Tissue inhibitors of metalloproteinases

TEM : Transformation endothéliale-mésenchymateuse

TGF- β 1 : Transforming growth factor beta

TAVI : Transcatheter aortic valve implantation

TNAP : Tissue non-specific alkaline phosphatase

U:

ucMGP : Uncarboxylated MGP

V:

VCAM-1 : Protéine d'adhésion vasculaire 1

VE : Vésicules extracellulaires

Vmax : Vitesse maximale du flux sanguin

VSMCs : Vascular smooth muscle cells

W:

WT : Wild type

WKY : Rats normotendus

LISTE DES TABLEAUX:

<u>Tableau 1</u> : Grades de sévérité de la sténose valvulaire aortique selon les recommandations de la Société Européenne de Cardiologie (ESC) (Helmut Baumgartner et al., 2017)[1].....	24
<u>Tableau 2</u> : Les différents phénotypes de cellules interstitielles valvulaires et leurs fonctions (Rajamannan et al., 2011)[2].....	41
<u>Tableau 3</u> : Différentes chimiokines et leurs récepteurs (Russo et al., 2014)[3].....	58
<u>Tableau 4</u> : Les cellules exprimant les récepteurs d'IL-8(C Russo et al., 2014)[3].....	62
<u>Tableau 5</u> : Liste des séquences d'amorces utilisées pour la Quantitative polymérase chain reaction (qPCR).....	82
<u>Tableau 6</u> : Liste des anticorps utilisés pour le Western blot.....	84
<u>Tableau 7</u> : L'IL-8 réduit l'expression d'OPN et favorise celle de MMP12 et d'élastine par les hVICs en condition pro-calcifiante.....	101

LISTE DES FIGURES :

<u>Figure 1</u> : Les facteurs de risque associés au développement du RAC (Rajamannan et al., 2011)[2].....	23
<u>Figure 2</u> : Outils de diagnostic du RAC (Peeters et al., 2017)[4].....	24
<u>Figure 3</u> : Algorithme de décision de traitement pour les patients atteints de sténose aortique (SA) qui répondent aux critères d'intervention (Boskovski MT et al., 2021)[5].....	32
<u>Figure 4</u> : Bioprothèse calcifiée (Amat-Santos IJ et al., 2020)[6].....	35
<u>Figure 5</u> : Les valves cardiaques (Olivier Varennes et al., 2017)[7].....	36
<u>Figure 6</u> : Structure normale de la valve et types cellulaires résidents (Nalini M. Rajamannan et al., 2011)[2].....	37
<u>Figure 7</u> : Les différents phénotypes des cellules valvulaires (Amber C Liu et al., 2007)[8].....	39
<u>Figure 8</u> : Les hVICs en culture monocouche (Amber C Liu et al., 2007).....	42
<u>Figure 9</u> : L'effet de la voie RANK/RANKL/OPG dans le tissu osseux et valvulaire (Tania A. Pawade et al., 2015)[9].....	43
<u>Figure 10</u> : Schéma des vésicules extracellulaires (VE) contribuant à la minéralisation (Bakhshian Nik et al., 2017)[10].....	47
<u>Figure 11</u> : L'épaississement de la valve aortique au cours du RAC (Najlah Kochtebane et al., 2012)[11].....	48
<u>Figure 12</u> : Modifications des composants de la MEC au cours du RAC (Ashley J. Scott et al., 2021)[12].....	49
<u>Figure 13</u> : Mécanisme de remodelage de l'élastine (Laurent Duca et al., 2016)[13].....	50
<u>Figure 14</u> : Effets des matrikines produites localement au cours de la progression de la calcification (Pascal Maurice et al., 2012)[14].....	52

Figure 15 : Les différents mécanismes impliqués dans le développement de la sténose valvulaire aortique (Marc R. Dweck et al., 2012)[15].....	53
Figure 16 : Les régions calcifiées des valves sténotiques sont caractérisées par la présence des lipides et des cellules inflammatoires (M Olsson et al.,1999)[16].....	54
Figure 17 : L’activation du TLR-3 par le traitement des hVICs avec Poly(I:C) induit la formation de dépôts de calcium qui est associée à une différenciation ostéogénique des hVICs (Qiong Zhan et al., 2015)[17].....	55
Figure 18 : Étapes similaires de progression des calcifications vasculaires et valvulaires (Sophie E.P. New et Elena Aikawa, 2011)[18].....	56
Figure 19 : Structure de la protéine CXCL-8 (Neamati et al., 2017)[19].....	60
Figure 20 : Cascades de signalisation CXCL8-CXCR1/2 (Neamati et al., 2017)[19].....	63
Figure 21 : L’expression d’IL-8 dans la région de l’endothélium et de l’intima du muscle lisse vasculaire de l’aorte thoracique des rats hypertendus (SHR) et normotendus(WKY) (Hyo Young KIM et al., 2008)[20].....	67
Figure 22 : Les 10 gènes ayant les scores de prédiction les plus élevés (Mu Liu et al., 2017)[21].....	69
Figure 23 : Prévention de la fibrillation atriale par l’inhibition pharmacologique de CXCR-2 (Zhang et al., 2020)[22].....	72
Figure 24 : Les différentes étapes de l’isolement des hVICs à partir des valves aortiques humaines récupérées des patients ayant subi un remplacement valvulaire chirurgical.....	78
Figure 25 : Les hVICs expriment les récepteurs CXCR1/2 (Cytométrie de flux).....	97
Figure 26 : les hVICs expriment CXCR1/2 (Western blot).....	98
Figure 27 : L’IL-8 augmente la calcification induite par le Pi des hVICs	99
Figure 28 : L’antagoniste des récepteurs de l’IL-8 (SCH527123) prévient la calcification des hVICs.....	100

Figure 29 : L'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 (SCH527123) prévient l'effet de l'IL-8 sur l'expression de l'élastine et de la MMP12 par les hVICs.....	101
Figure 30 : L'IL-8 augmente la libération de MMP12 par les hVICs.....	103
Figure 31 : L'effet de l'IL-8 sur la calcification dépend de MMP12 et de la présence de l'élastine.....	104
Figure 32 : L'IL-8 induit une activation de la voie NFκB, effet prévenu par l'antagoniste SH527123 de CXCR1/2.....	105
Figure 33 : L'inhibition de la voie NFκB réduit l'effet de l'IL-8 sur la calcification et l'expression de MMP12 et d'élastine.....	106
Figure 34 : L'IL-8 induit une dégradation de l'élastine, effet prévenu en bloquant les récepteurs CXCR1/2, la voie NFκB ou la métalloprotéase MMP12.....	107
Figure 35 : L'expression de CXCR1, CXCR2 et MMP12 est plus marquée dans les zones calcifiées des valves aortiques des patients atteints de RAC et est associée à une moindre expression de l'élastine intacte.....	109
Figure 36 : Les zones calcifiées des valves contiennent objectivement plus de calcium que les zones non calcifiées.....	106
Figure 37 : L'expression de CXCR1, CXCR2, MMP12 et de la forme dégradée d'élastine est plus importante dans les zones calcifiées que dans les zones non calcifiées des valves des patients atteints de RAC.....	111
Figure 38 : L'IL-8 favorise la calcification induite par Pi des valves aortiques porcines en culture et cet effet est prévenu par le blocage de CXCR1/2, l'inhibition de la voie NFκB ou de la métalloprotéase MMP12.....	113
Figure 39 : Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit la calcification des valves.....	115
Figure 40 : Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit l'hyperleucocytose sanguine	116
Figure 41 : Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit l'infiltration de certaines cellules inflammatoires dans les valves implantées en SC.....	117

Figure 42 : Proposition de mécanisme induit par l'IL-8 en faveur de la calcification valvulaire aortique.....128

RÉSUMÉ

L'inflammation joue un rôle critique dans les mécanismes de calcification de la valve aortique. Dans ce travail, nous montrons que la calcification des cellules interstitielles de valves aortiques humaines (hVICs) en culture est significativement amplifiée par l'ajout d'IL-8 ou de sérum de patients atteints de rétrécissement aortique calcifié (RAC) et que cet effet est prévenu en bloquant pharmacologiquement les récepteurs CXCR1/2. L'effet procalcifiant de l'IL-8 est associé à une augmentation de la dégradation de l'élastine et impliquerait la voie de signalisation NFκB et l'expression de la métalloprotéase MMP12. Ces résultats sont renforcés par l'observation que les valves aortiques de patients atteints de RAC montrent une surexpression de CXCR1/2 et MMP12 et une dégradation de l'élastine dans les zones calcifiées par rapport aux zones non calcifiées. Par ailleurs, dans un modèle de calcification de valves de porc implantées en sous-cutané chez le rat, nous montrons un effet préventif du blocage pharmacologique de CXCR1/2. L'IL-8 pourrait exercer un effet procalcifiant de façon directe sur les hVICs ou indirecte en limitant l'infiltration leucocytaire.

Mots clés : cellules interstitielles valvulaires, rétrécissement aortique calcifié, interleukine-8, CXCR1/2, inflammation.

ABSTRACT

Inflammation plays a critical role in the mechanisms of aortic valve calcification. In this work, we show that the calcification of human aortic valve interstitial cells (hVICs) in culture is significantly amplified by the addition of IL-8 or sera from patients with calcific aortic valve stenosis (CAVS) and that this effect is prevented by pharmacologically blocking CXCR1/2 receptors. The procalcifying effect of IL-8 is associated with an increase in the degradation of elastin and would involve the NFκB signaling pathway and the expression of the metalloprotease MMP12. These results are reinforced by the observation that the aortic valves of patients with CAVS show an overexpression of CXCR1/2 and MMP12 and a degradation of elastin in the calcified areas compared to the non-calcified areas. Moreover, in a model of calcification of pig valves implanted subcutaneously in rats, we show a preventive effect of the pharmacological blockade of CXCR1/2. IL-8 could exert a procalcifying effect directly on hVICs or indirectly by limiting leukocyte infiltration.

Key words : interstitial valve cells, aortic valve stenosis, interleukin-8, CXCR1/2, inflammation.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le rétrécissement aortique calcifié

Dans ce chapitre, nous détaillerons l'épidémiologie, le diagnostic et le traitement du rétrécissement aortique calcifié (RAC) ou « Calcific Aortic Valve Stenosis (CAVS) » en Anglais.

1.1. Épidémiologie, facteurs de risque et aspects cliniques

Le RAC est la cardiopathie valvulaire la plus fréquente dans les pays industrialisés. C'est une maladie liée au vieillissement de la population. Il consiste en une sclérose de la valve aortique, entraînant avec le temps une sténose aortique, qui progresse en un remaniement fibro-calcique. Parmi les pathologies cardiovasculaires, le RAC occupe la troisième position en terme de prévalence, après les coronaropathies et l'hypertension artérielle [7]. La morbidité est estimée de 2,5 millions en 2000 et devrait augmenter jusqu' à 4,5 millions en 2030 [23]. Chaque année 85000 patients atteints de sténose valvulaire aortique aux États-Unis et 275000 dans le monde subissent une chirurgie de remplacement valvulaire [24]. Les causes du RAC se résument en trois principales causes. La première est dégénérative. C'est la cause la plus fréquente. Elle est le résultat d'un phénomène actif, qui associe le remaniement fibro-calcique de la valve aortique mais aussi de l'anneau mitral ou du septum interventriculaire. La deuxième cause est la bicuspidie aortique, c'est une anomalie congénitale qui se manifeste par la présence de deux feuillets valvulaires au lieu de trois. Chez les patients porteurs d'une bicuspidie, des mutations génétiques ont été identifiées. Ces mutations existent dans NOTCH1 et dans GATA (la famille des doigts à zinc), et induisent des calcifications et des altérations de la matrice extracellulaire (MEC) causées par une dérégulation de métalloprotéases matricielles (MMPs) [25]. La dernière cause décrite est d'origine rhumatismale. Cette cause est devenue rare et ne présente que 5 % des causes de RAC [7].

Concernent les facteurs de risque associés à la sténose valvulaire aortique, chez 5 201 sujets âgés de 65 ans ou plus, inscrits à la « Cardiovascular Heart Study », des facteurs ont été identifiés et comprenaient l'âge (deux fois plus de risque pour chaque augmentation d'âge de 10 ans), le sexe masculin (deux fois plus de risque), le tabagisme actif (augmentation de 35 % du risque) et des antécédents d'hypertension (augmentation de 20 % du risque). D'autres facteurs importants comprenaient le poids et une concentration sanguine élevée de Lp(a) (lipoprotéine a) et de LDL-Cholesterol (Low density Lipoprotein Cholesterol) (**Figure 1**) [26].

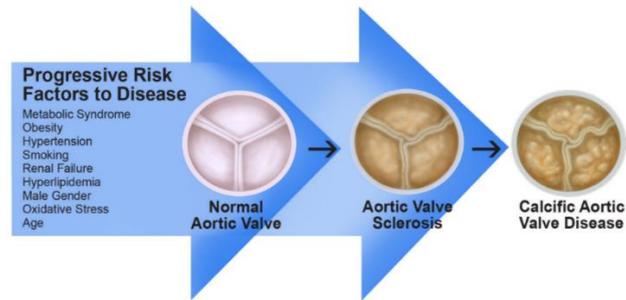


Figure 1 : Les facteurs de risque associés au développement du RAC (Rajamannan et al., 2011)[2]

Plusieurs facteurs de risque peuvent intervenir pendant le développement du RAC qui débute par une sclérose valvulaire aortique et progresse en une sténose aortique dans une étape plus avancée.

Au cours du RAC, les patients peuvent rester asymptomatiques même lorsque la valve se rétrécit en « sténose aortique », où la surcharge de pression entraîne une hypertrophie ventriculaire gauche progressive. Lorsque le rétrécissement aortique devient serré, des symptômes commencent à apparaître et comprennent la dyspnée et/ou la syncope d’effort, l’angor ainsi que des troubles rythmiques et/ou conductifs. À ce stade il est urgent d’intervenir rapidement. Sans intervention, le décès survient en quelques mois ou années [23].

1.2. Diagnostic

Plusieurs méthodes d’imagerie sont utilisées actuellement pour le diagnostic du RAC : l’échocardiographie, la tomodensitométrie (computed tomography ou CT-scan), et la tomographie par émission de positrons (positron emission tomography ou PET-scan). Ces outils d’imagerie permettent de suivre le développement de la maladie et d’estimer sa sévérité pour une prise de décision concernant le remplacement valvulaire (**Figure 2**) [4].

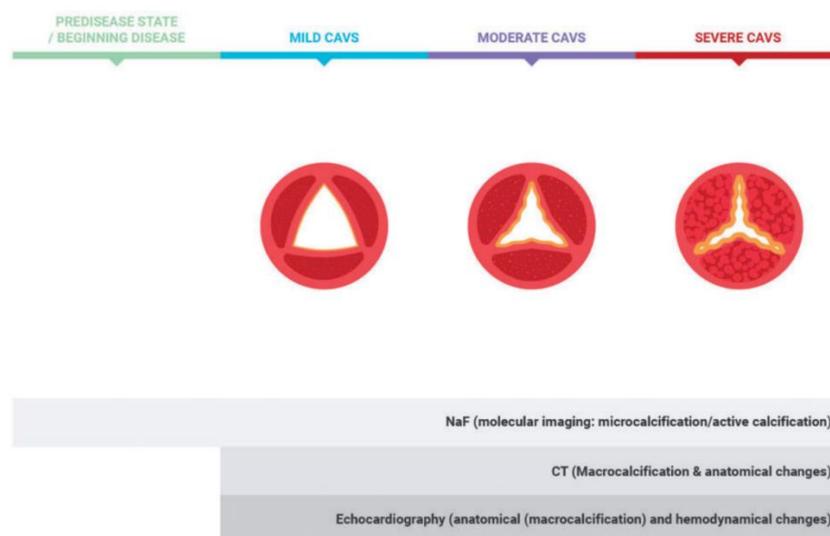


Figure 2 : Outils de diagnostic du RAC (Peeters et al., 2017)[4]

L'échocardiographie est la méthode d'imagerie de référence pour diagnostiquer la sténose aortique et évaluer son degré de sévérité. Il s'agit d'une technique non invasive qui repose sur l'utilisation des ultrasons. L'avantage de cette méthode est sa simplicité, son coût relativement faible et sa facilité d'utilisation. Elle offre d'excellentes performances pour l'évaluation des paramètres hémodynamiques transvalvulaires, mais reste descriptive et non précise pour mesurer le degré de calcification [9]. Les paramètres hémodynamiques principaux mesurés à l'échocardiographie-Doppler sont : l'aire valvulaire aortique (AVA) exprimée en cm^2 , la vélocité maximale du flux sanguin (V_{max}) exprimée en m/s et le gradient transvalvulaire aortique moyen (GM) exprimé en mmHg. Ces paramètres permettent de classer la sévérité de la sténose valvulaire aortique en 3 stades : légère, modérée et sévère (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Grades de sévérité de la sténose valvulaire aortique selon les recommandations de la Société Européenne de Cardiologie(ESC) (Helmut Baumgartner et al., 2017)[1]

	Sténose aortique légère	Sténose aortique modérée	Sténose aortique sévère
AVA (cm^2)	> 1,5	1,0-1,5	< 1,0
V_{max} (m/s)	2,6-2,9	3,0-4,0	$\geq 4,0$
GM (mmHg)	< 20	20-40	≥ 40

De façon complémentaire, la tomодensitométrie permet une évaluation de la calcification plus détaillée et reproductible que l'échographie. Un score calcique peut être établi afin de quantifier la masse, la densité et/ou le volume de la calcification valvulaire macroscopique. Le score calcique est mesuré en unités *Hounsfield* (HU) qui est une évaluation de l'atténuation des rayons X traversant la structure valvulaire, en donnant la valeur de référence zéro à l'eau [27]. Une corrélation entre le degré de calcification valvulaire mesurée par la méthode d'*Agatston* et la sévérité de la sténose aortique a été montrée [28] [29]. Cet outil de diagnostic fournissant des informations complémentaires à l'échocardiographie permettrait d'affiner la prise de décision d'un remplacement valvulaire. Toutefois, bien que cette méthode fournisse une excellente quantification de la calcification valvulaire chez le patient, elle ne permet pas de comprendre les mécanismes biologiques en cours [30].

À l'inverse, la tomographie par émission de positons (TEP) est une méthode d'imagerie qui apporte des informations sur les mécanismes biologiques en cours chez les patients atteints de sténose aortique, en fonction du traceur isotopique employé. L'inflammation et la calcification peuvent être ciblées à l'aide de deux marqueurs radioactifs les plus couramment utilisés : ^{18}F - Fluorodésoxyglucose (^{18}F - FDG) et le ^{18}F - Sodium fluoride (^{18}F - NaF), respectivement. L'augmentation de l'absorption de ^{18}F - FDG valvulaire a été démontrée récemment dans le RAC et associée à une progression plus rapide de la maladie [31]. Le ^{18}F - NaF a été initialement utilisé pour la détection des métastases osseuses et les tumeurs ostéoblastiques primaires [32]. Le fluorure se lie préférentiellement aux cristaux d'hydroxyapatite en cours de formation. Le ^{18}F - NaF s'accumule surtout dans les zones de microcalcifications, et peu dans les zones des macrocalcifications [33]. L'analyse histologique de l'absorption du ^{18}F - NaF dans la valve sténotique montre une corrélation avec des protéines impliquées dans la calcification. En outre, les zones de microcalcifications marquées au ^{18}F - NaF progressent avec le temps en macrocalcifications. Ainsi, la TEP par ^{18}F - NaF permettrait de prédire précocement le développement de la calcification valvulaire aortique et pourrait par conséquent servir à l'évaluation de l'efficacité de nouveaux traitements pharmacologiques [34].

1.3. Biomarqueurs de la sténose valvulaire aortique

Les biomarqueurs sont des paramètres biologiques considérés comme indicateurs de processus biologiques normaux, de processus pathogènes ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique. Les biomarqueurs peuvent être utilisés comme marqueurs de diagnostic et de pronostic [35]. Plusieurs biomarqueurs ont fait l'objet d'étude dans le RAC.

a. Peptides natriurétiques

Une pression excessive dans les cavités du cœur provoque la libération de polypeptides natriurétiques (PN), tels que le peptide natriurétique cérébral (PNC) et le peptide natriurétique auriculaire (PNA). Le PNC, appelé couramment peptide natriurétique de type B (BNP) est libéré par les ventricules cardiaques et le PNA (ou encore ANP) par les oreillettes, mais les deux peuvent également être libérés par l'un ou l'autre compartiment. Depuis de nombreuses années, le BNP est utilisé dans le diagnostic et le pronostic de l'insuffisance cardiaque aiguë ou chronique avec une corrélation directe avec la gravité de l'insuffisance cardiaque [36]. Des études ont par ailleurs mis en évidence une corrélation entre le BNP et la gravité de la sténose aortique. La concentration de BNP plasmatique est en effet augmentée chez les patients atteints de sténose aortique et présentant des symptômes [37][38][39]. En outre, chez 953 patients atteints de sténose aortique modérée ou sévère, il a été montré que le BNP était un facteur pronostique de la mortalité à long terme [40]. Le BNP pourrait être utilisé pour évaluer le pronostic de la sténose aortique, la stratification des risques et le moment de l'intervention [41].

b. Troponines

Les troponines sont des protéines régulatrices qui composent les tissus squelettiques et musculaires cardiaques striés [41]. Ils sont considérés comme des marqueurs spécifiques des lésions myocardiques. Les valeurs de concentration plasmatique de troponines augmentent dans diverses pathologies, notamment dans l'insuffisance cardiaque aiguë et chronique. Dans la sténose aortique, une valeur élevée de troponine plasmatique est considérée comme un marqueur de mauvais pronostic. Chez les patients atteints de sténose aortique asymptomatique, des concentrations plasmatiques élevées de troponine ont été associées à la présence d'une hypertrophie avancée, une fibrose myocardique de

remplacement et une fréquence plus élevée de recourt au remplacement valvulaire ou de décès cardiovasculaire [42][43].

c. Protéine C-réactive

L'inflammation joue un rôle important dans les maladies cardiovasculaires et est caractérisée par la production hépatique de la protéine C-réactive (CRP). Des concentrations élevées de CRP ont été rapportées chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque [44]. Par ailleurs, une augmentation des valeurs de CRP a été retrouvée chez des patients atteints de sténose aortique et montre une corrélation directe avec le taux de recourt au remplacement valvulaire [45][46].

d. Galectine-3

La galectine-3 est une glycoprotéine de la famille des lectines sécrétée entre autre par les macrophages et capable de se lier aux β -galactosides. Elle est capable de réguler positivement ou négativement divers processus cellulaires (métabolisme et cycle cellulaires, transcription et traduction des gènes, trafic des organelles, dialogue entre membranes), ce qui lui permet de coordonner une réponse adaptée au stress cellulaire et de contribuer ainsi à sa résolution, induire l'autophagie, voire l'apoptose, pour rétablir l'homéostasie du tissu. La galectine-3 plasmatique est un biomarqueur impliqué dans plusieurs pathologies inflammatoires [47]. Des concentrations plasmatiques élevées de galectine-3 seraient corrélées à un risque accru d'insuffisance cardiaque et de mortalité [48]. La galectine-3 serait surexprimée chez les patients atteints de sténose aortique [49]. Cependant, dans une étude portant sur 583 patients ayant subi un remplacement valvulaire par voie transcathéter, aucune corrélation n'a été observée entre les concentrations de galectine-3 plasmatique et la gravité de la sténose aortique [50].

e. Facteur de croissance-15

Le facteur de différenciation et de croissance-15 (GDF-15) est une cytokine qui joue un rôle important dans l'inflammation et l'apoptose [51]. Les concentrations de GDF-15

plasmatique ont été élevées chez les patients atteints de sténose aortique et ont été corrélées à la sévérité des symptômes [52].

f. MicroARN (miARN)

Les microARN (miARN) sont des petites molécules d'ARN non codantes composées de 22 à 26 nucléotides jouant un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des protéines [53]. Les miARN retrouvés dans la circulation générale constituent des biomarqueurs potentiels de processus biologiques pathologiques. Plusieurs études montrent que certains miARN circulants sont davantage exprimés au cours de la sténose valvulaire aortique: miRNA-125b, miRNA-451a, miRNA-22-3p [54][55] ; alors que d'autres sont réprimés: miRNA-141, miRNA-148a-3p, miRNA-24-3p et miRNA-382-5p [56][57][55]. La signification physiopathologique et l'intérêt clinique de ces observations nécessitent des études complémentaires.

1.4. Traitement pharmacologique

À ce jour, aucune intervention pharmacologique n'a été validée pour freiner la progression du RAC. Le seul traitement proposé aux patients atteints du RAC symptomatique est le remplacement valvulaire chirurgical ou par voie percutanée « TAVI » (*transcatheter aortic valve implantation*). Cependant, plusieurs études ont tenté de réorienter dans le RAC certaines approches pharmacologiques déjà employées dans d'autres affections cardiovasculaires.

a. Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et bloqueurs du récepteur AT1 de l'angiotensine

Le système rénine-angiotensine (RAS) joue un rôle important dans les maladies cardio-vasculaires. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine 2 (ARA2) sont connus pour réduire les effets du RAS sur le remodelage cardiovasculaire. Une étude a montré que le traitement par IEC ne semblait pas ralentir la progression hémodynamique de la sténose valvulaire [58]. En revanche, une autre étude a montré que les ARA2 pourraient atténuer la fibrose et la

calcification valvulaires [59]. Les IEC et les ARA2 pourraient par ailleurs améliorer certains symptômes (dyspnée et tolérance à l'effort) ainsi que la survie chez les patients atteints de RAC [60], mais le niveau de preuve reste faible du fait de l'absence d'essai thérapeutique randomisé.

b. Statines

Les statines sont des inhibiteurs spécifiques de l'hydroxyméthylglutaryl coenzyme A-réductase (HMG-CoA-réductase), enzyme clé du métabolisme du cholestérol. Elles sont couramment employées pour corriger certaines dyslipidémies (notamment associée à un taux sanguin élevé de LDL et de cholestérol total) dans le but de réduire le dépôt lipidique au cours de l'athérosclérose. Bien que certains travaux aient suggéré que les statines pourraient également réduire la progression de la sténose valvulaire aortique, notamment en terme de paramètres hémodynamiques échographiques [58], les effets bénéfiques sur le développement du RAC restent limitées. En effet, les statines peuvent réduire le dépôt lipidique dans la phase d'initiation de la maladie, mais ont peu d'effet une fois la phase de propagation établie lorsque la fibrose et la calcification sont les processus pathologiques dominants [61].

c. La lipoprotéine(a)

La lipoprotéine(a) ou LP(a) est une lipoprotéine qui présente les mêmes caractéristiques de densité et dimensions que les LDL. Il s'agit d'une particule LDL modifiée composée de LDL et d'apolipoprotéine(a) (apo[a]). La Lp(a) est désormais reconnue comme un facteur de risque majeur et indépendant du RAC [62]. L'élévation de la Lp(a) serait un facteur de risque génétique très répandu (environ 20 % des personnes) pour les maladies cardiovasculaires et la sténose valvulaire aortique. Un polymorphisme nucléotidique unique dans le locus de la LP(a) a en effet été lié à la sténose valvulaire aortique [63]. Plusieurs études se sont intéressées à cibler la Lp(a) pour ralentir la progression du RAC. Les statines n'ont montré aucune efficacité dans la réduction de Lp(a) chez les patients atteints de sténose valvulaire aortique [64]. Cependant, d'autres agents thérapeutiques incluant IONIS-APO(a)Rx et IONIS APO(a)-LRx (des oligonucléotides antisens [ligand-conjugués] ciblant l'ARNm de l'apolipoprotéine(a) hépatique) ont été étudiés dans des essais de phase 1 et 2, et semblent capables de réduire significativement (baisse de l'ordre de 70%) les concentrations

plasmatiques de Lp(a) chez les patients atteints de sténose valvulaire aortique [65], mais l'impact de cet effet sur la progression de la maladie reste à démontrer.

d. Bisphosphonates et dénosumab

Les traitements de l'ostéoporose (par exemple les bisphosphonates ou le dénosumab) pourraient avoir un effet bénéfique sur la calcification vasculaire et valvulaire tout en préservant le métabolisme osseux [66]. Les bisphosphonates inhibent la résorption osseuse médiée par les ostéoclastes, réduisant la perte osseuse associée à l'ostéoporose [67]. Les bisphosphonates sont des analogues stables des pyrophosphates. Ces médicaments peuvent inhiber la résorption osseuse à travers leur effets sur la fonction des ostéoclastes [68]. Il a de plus été montré qu'ils peuvent aussi réduire la minéralisation. Certains bisphosphonates inhibent la résorption osseuse et la minéralisation à la même concentration alors que d'autres ont besoin de concentrations plus élevées pour inhiber la minéralisation de l'os que celles qui inhibent sa résorption. Il a été suggéré que les bisphosphonates ont la capacité de réduire le taux de calcium et le phosphate dans le sérum ce qui explique leur effet sur la calcification des tissus. Les bisphosphonates ont également un rôle anti-inflammatoire en inhibant la voie du mévalonate impliquée dans la synthèse du cholestérol. Les bisphosphonates pourraient se diffuser dans la valve, inhiber la formation de médiateurs inflammatoires et réduire ainsi la calcification [69]. De façon générale, le taux moyen de progression du RAC est associé à une réduction de la surface valvulaire aortique d'environ 0,1 cm² par année [70][71]. Une étude intéressante concernant l'effet des bisphosphonates sur la progression de la sténose valvulaire aortique a montré que le groupe témoin non traité par bisphosphonate a présenté une réduction de la surface valvulaire aortique de 0,2 cm² sur 2 ans alors que le groupe traité par bisphosphonate a présenté une augmentation de cette surface de 0,1 cm² sur 2 ans [72]. Ces résultats sont cohérents avec ceux de *Skolnick et al.* montrant que les bisphosphonates pourraient ralentir la progression de la sténose aortique [73].

e. Vitamine K

La vitamine K est une vitamine liposoluble qui montre des effets protecteurs vis-à-vis des calcifications cardiovasculaires [74][75]. Une étude réalisée par *Brandenburg et al.* chez des patients atteints de sténose valvulaire aortique a montré que sur 1an, le score de

calcification valvulaire aortique a diminué jusqu'à 10 % chez les patients traités avec de la vitamine K contre une progression de 22 % dans le groupe témoin [76], suggérant qu'une supplémentation en vitamine K permettrait de ralentir la progression du RAC [77][74]. La vitamine K est essentielle pour l'activation de la protéine Gla matricielle (MGP) connue pour être un puissant inhibiteur des calcifications cardiovasculaires [78]. À l'inverse, il est possible que l'utilisation des anticoagulants anti-vitamines K puisse favoriser les calcifications cardiovasculaires [79].

1.5. Traitement non pharmacologique du RAC

Comme déjà mentionné, le seul traitement proposé à ce jour aux patients atteints de RAC serré symptomatique est le remplacement valvulaire aortique (RVA) qui peut être réalisé par voie chirurgicale ou par approche transcathéter (TAVI pour *transcatheter aortic valve implantation*). Le RVA chirurgical nécessite la mise en place d'une circulation extracorporelle et l'arrêt cardioplégique du cœur alors que le RVA par TAVI est effectué par voie percutanée, sous anesthésie locale. Le RVA chirurgical présente un risque de complications périopératoires comme la fibrillation auriculaire, l'arrêt cardiaque qui nécessite l'utilisation d'un stimulateur cardiaque permanent, les transfusions sanguines, l'insuffisance respiratoire, l'insuffisance rénale, l'infection, l'accident vasculaire cérébral. Le TAVI est une source de complications pouvant être différentes de la chirurgie. Il présente des anomalies de la conduction nécessitant l'insertion d'un stimulateur cardiaque, des fuites paravalvulaires, des accidents vasculaires cérébraux et des complications vasculaires en plus des effets moins courants tels que l'obstruction coronarienne, la rupture annulaire ou l'embolisation valvulaire [80]. Au cours de la dernière décennie, le RVA par TAVI était une solution pour les patients inopérables. Il est devenu désormais le traitement le plus souvent utilisé pour le traitement de la sténose valvulaire aux États-Unis et en Europe [81]. Le pourcentage de mortalité périopératoire entre RVA chirurgical et TAVI est similaire (<1 % chez les patients à faible risque, 2 à 4 % chez les patients à risque intermédiaire et 3 à 7 % chez les patients à haut risque) [82].

a. Choix de l'intervention

Le choix de la méthode d'intervention pour traiter une sténose aortique dépend de plusieurs critères d'évaluation : (1) la survie à long terme attendue du patient (en supposant que la sténose aortique est traitée), (2) les facteurs de comorbidité qui peuvent affecter le

risque chirurgical ou celui de complications tardives et (3) les caractéristiques pathoanatomiques (**Figure 3**). Les recommandations évoluent régulièrement en fonction des technologies disponibles et des données publiées sur l'efficacité à court et à long terme, la possibilité de réintervention, les facteurs de comorbidité du patient qui influencent à la fois le risque chirurgical et la survie attendu du patient, ainsi que l'avis du patient. Toutes ces critères sont discutés par une équipe cardiaque multidisciplinaire [5].

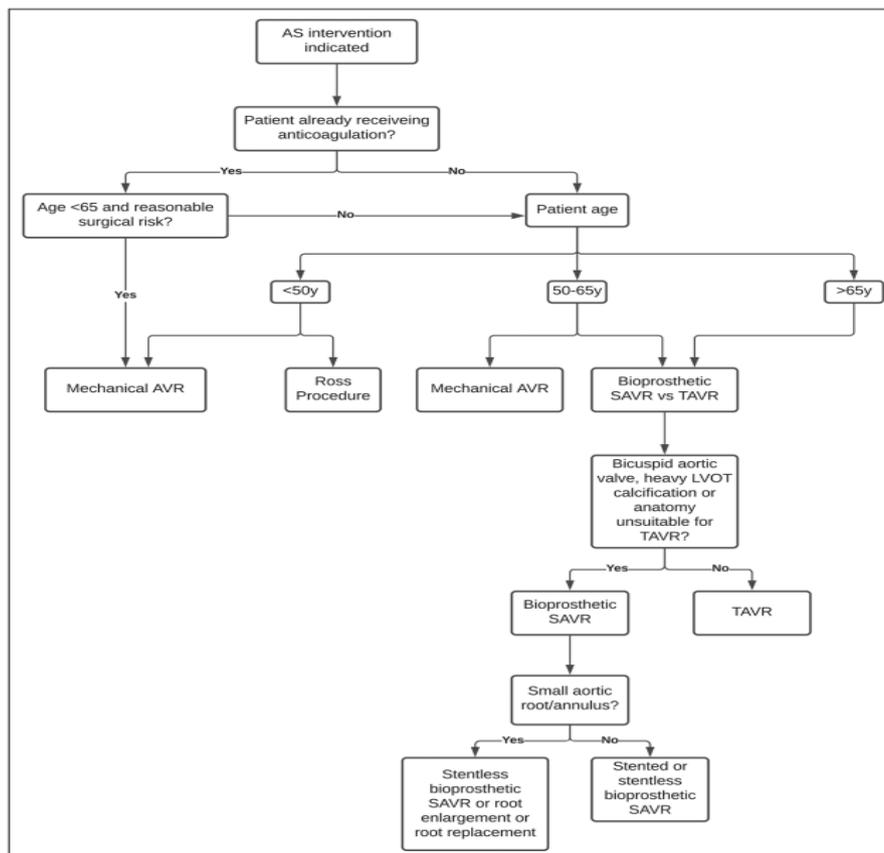


Figure 3 : Algorithme de décision de traitement pour les patients atteints de sténose aortique (SA) qui répondent aux critères d'intervention (Boskovski MT et al., 2021)[5]

AVR: aortic valve replacement; LVOT, left ventricular outflow tract; SAVR, surgical AVR; and TAVR, transcatheter AVR

Pour un patient âgé ou ayant des comorbidités qui limitent sa survie, le TAVI est généralement recommandé. Pour les patients plus jeunes de moins de 60 ans un RVA chirurgical avec une valve mécanique était recommandé. Néanmoins, au cours des dernières

décennies, une augmentation croissante de l'utilisation de valves bioprothétiques chez les patients plus jeunes a été constatée compte tenu de l'amélioration de la durabilité de ces bioprothèses et des moindres contraintes de suivi. En effet, en cas de valves mécaniques un traitement anticoagulant (par antivitamine K) est nécessaire, imposant une surveillance stricte afin de limiter les risques de sous ou surdosages. Le RVA chirurgical peut être effectué en utilisant des prothèses biologiques ou mécaniques alors que le TAVI est réalisé avec une bioprothèse associée à un ballon-extensible, auto-extensible ou des prothèses mécaniquement extensibles.

b. Les prothèses mécaniques

Les prothèses mécaniques introduites pour la première fois par *Hufnagel* en 1952 étaient les premières prothèses utilisées [83]. L'avantage principal des prothèses mécaniques est leur durabilité. En effet, les prothèses mécaniques modernes à *bileaflet* ne présentent aucune dégénérescence structurelle. Le suivi des patients jusqu'à 25 ans après RVA chirurgical montre que ces valves persistent sans aucune dégénérescence [84]. Cependant, pour éviter le risque des complications thromboemboliques, l'anticoagulation est nécessaire. Les saignements sont plus fréquents avec les prothèses mécaniques en comparaison avec les bioprothèses [85].

c. Les prothèses biologiques

Les prothèses biologiques ou bioprothèses sont composées de valves aortiques porcines ou de pièces de péricarde bovin et sont fabriquées d'une manière qui les permette d'imiter étroitement les valves aortiques natives. Elles sont conservées dans du glutaraldéhyde (GA) afin de tanner le tissu et le conserver en inhibant la dégradation enzymatique. Récemment, une nouvelle technique de préservation des bioprothèses a été utilisée. Cette technique nécessite un traitement au glycérol et permet de bloquer les résidus aldéhydes empêchant ainsi le besoin d'utilisation de GA [86].

d. Détérioration/dégénérescence des prothèses

À l'opposé des prothèses mécaniques, les bioprothèses implantées par RVA chirurgical ou TAVI ne nécessitent pas d'anticoagulation mais peuvent subir une détérioration ou dégénérescence valvulaire (DV). Cette détérioration peut être associée à une calcification prothétique après environ 7 à 8 ans de l'implantation (**Figure 4**). Généralement, on considère qu'il y a une DV dans le cas d'une défaillance de la valve nécessitant une réintervention. Cette définition permet de donner un aperçu de la durabilité des prothèses, et de faire une comparaison entre les différents types de prothèses [87], mais elle n'exclut pas qu'un processus précoce ait été initié peu de temps après implantation. Plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle dans la DV. Le sujet jeune est plus à risque de DV. À 15 ans de l'intervention, 22 % des patients de 50 ans, 30 % des patients de 40 ans, 30% des patients de 30 ans, et 50% des patients de 20 ans auront besoin d'une réopération à cause d'une DV. Autres facteurs peuvent également affecter la durabilité des bioprothèses comme l'hypertension, l'hypertrophie du ventricule gauche et l'hyperparathyroïdie [88]. Les bioprothèses de nouvelle génération durent plus longtemps que les plus anciennes [89]. Toutefois, malgré de nombreuses comparaisons entre différents types de prothèses, aucun avantage définitif n'a été démontré pour une prothèse en particulier. Dans le cas d'une DV, la planification de la réintervention est réalisée en prenant en compte les mêmes critères cliniques et échocardiographiques que les natives [90]. La fréquence de réintervention à long terme pour DV est généralement de 2 à 3 % à 10 ans et 15 à 20 % à 20 ans après la première intervention. Une réintervention par TAVI ou RVA chirurgical est plus complexe et peut souvent nécessiter une chirurgie de la racine aortique plus étendue que lors de la première intervention en raison de la cicatrisation et de la calcification étendues autour de la prothèse [91]. Une autre approche, appelée *Valve-in-valve* (ViV) TAVI, présente une approche moins invasive que le RVA réopératoire car elle permet de réduire les difficultés techniques et les limites liées à l'explantation de la prothèse valvulaire [92].

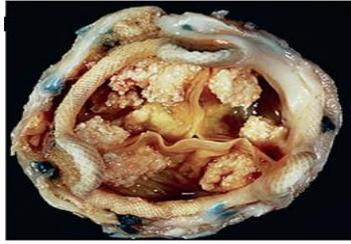


Figure 4 : Bioprothèse calcifiée (Amat-Santos IJ et al., 2020)[6]

e. Calcification des prothèses

Plusieurs facteurs peuvent être impliqués dans la calcification des bioprothèses comme le jeune âge du receveur, le stress mécanique élevé ainsi que le prétraitement du dispositif avec du GA [5]. En effet, le GA stabilise et modifie certains sites riches en phosphore dans le tissu bioprothétique favorisant la minéralisation lors de l'implantation lorsque ces sites sont exposés à des niveaux élevés de calcium dans le liquide extracellulaire. Par ailleurs, la calcification des protéines de la MEC telles que le collagène et l'élastine a été observée cliniquement. Les fibres élastiques et de collagène peuvent servir de sites de nucléation pour le phosphate et le calcium, indépendamment des composants cellulaires de la bioprothèse (**Figure4**) [93]. La calcification des protéines de la MEC, le collagène et l'élastine, a été observée dans des implants de tissus valvulaires bioprothétiques dans un modèle d'implantation sous-cutanée chez le rat [94]. De plus, la minéralisation est généralement accélérée sur les sites de déformations mécaniques intenses générées par le mouvement, comme les points de flexion des valves cardiaques. Ce stress mécanique n'est pas appliqué à la bioprothèse implanté en sous-cutanée, ce qui présente un principal limite de l'utilisation des modèles de calcification des bioprothèses valvulaires.

Le mécanisme de calcification dans les cuspidés des bioprothèses est initié principalement dans les cellules mortes du tissu conjonctif qui ont été dévitalisées mais non éliminées pendant le prétraitement au GA. En outre, les mécanismes physiologiques d'élimination du calcium par les cellules dévitalisées des tissus prétraités au GA ne sont plus fonctionnels et le calcium s'accumule à l'intérieur des cellules. Les membranes cellulaires et autres structures intercellulaires sont riches en phosphore (sous forme de phospholipides comme la phosphatidylsérine) qui a la capacité de se lier au calcium et former des sites de nucléation. Les dépôts de calcification s'accumulent, entraînant des nodules minéralisés qui affaiblissent les tissus et provoquent ainsi un dysfonctionnement de la bioprothèse [89].

2. Mécanismes physiopathologiques du RAC

2.1. Rappels anatomiques et histologiques de la valve aortique

Comme le cœur d'un adulte bat environ 70 fois par minute, les valves cardiaques doivent s'ouvrir et se refermer plus de 100 000 fois par jour afin de maintenir le flux du sang unidirectionnel. Le cœur contient deux types de valves: les valves auriculo-ventriculaires (AV), comprenant les valves mitrale et tricuspide qui séparent les oreillettes des ventricules des côtés gauche et droit respectivement, et les valves semi-lunaires aortique et pulmonaire qui séparent les ventricules des grandes artères. Les valves pulmonaire, aortique et tricuspide sont constituées de trois valvules ou cuspides, la valve mitrale en possède deux (**Figure 5**).

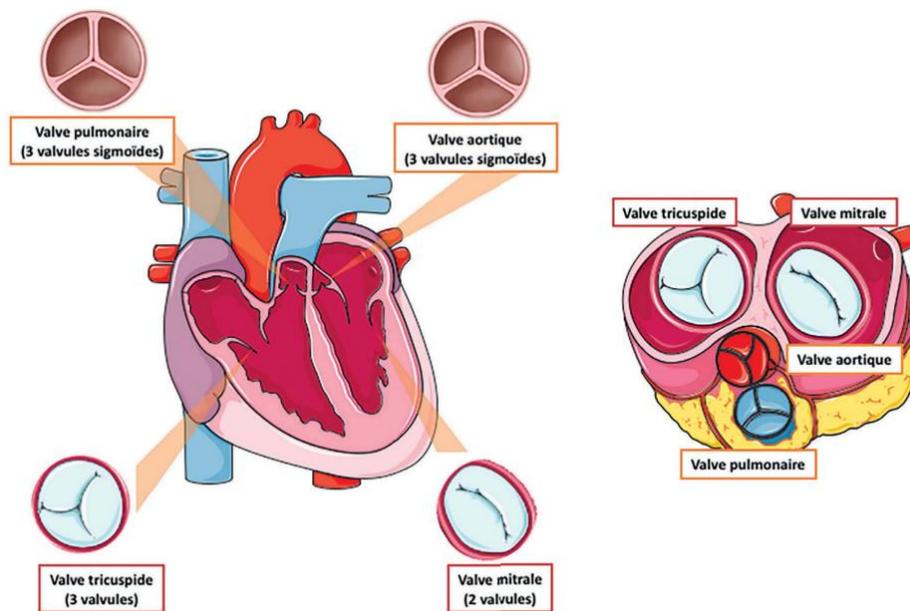


Figure 5 : Les valves cardiaques (Olivier Varennes et al., 2017)[7]

Ces valves sont constituées de deux types cellulaires localisés dans deux feuillets différents : les cellules endothéliales valvulaires (hVECs) localisées dans le feuillet externe de la valve, et les cellules interstitielles valvulaires (hVICs) enchâssées dans la MEC composée de trois différentes couches. Ces trois couches sont respectivement : la *fibrosa*, la *spongiosa* et la *ventricularis*. La *fibrosa*, feuillet situé vers la face extérieure de la valve, est riche en collagène. La matrice de collagène est composée de collagène de type I (70%), et environ 25% de type III [95][96]. Les fibres de collagène sont alignées, ce qui permet de

supporter une grande partie de la pression transvalvulaire exercée lorsque la valve est fermée. Le feuillet médian appelé *spongiosa*, est riche en glycosaminoglycane (GAG) et protéoglycane (PG) et moins riche en collagène. Cette matrice plus compressible permet à la valve d'absorber une force élevée due à la mise en mouvement et en pression de la valve. En outre, l'hydrophilie élevée des protéoglycane réduit le cisaillement entre la *fibrosa* et la *ventricularis*. Le dernier feuillet situé vers la face interne de la valve, appelé *ventricularis*, est composé de fibres d'élastine orientées radialement qui facilitent le mouvement des tissus en s'étendant lorsque le feuillet de la valve s'ouvre et en reculant pendant la fermeture de la valve. Ces fibres favorisent en effet la fermeture de la valve en fin de diastole et maintiennent la pression mécanique produite par l'alternance des phases systoliques et diastoliques (**Figure 6**) [97][96].

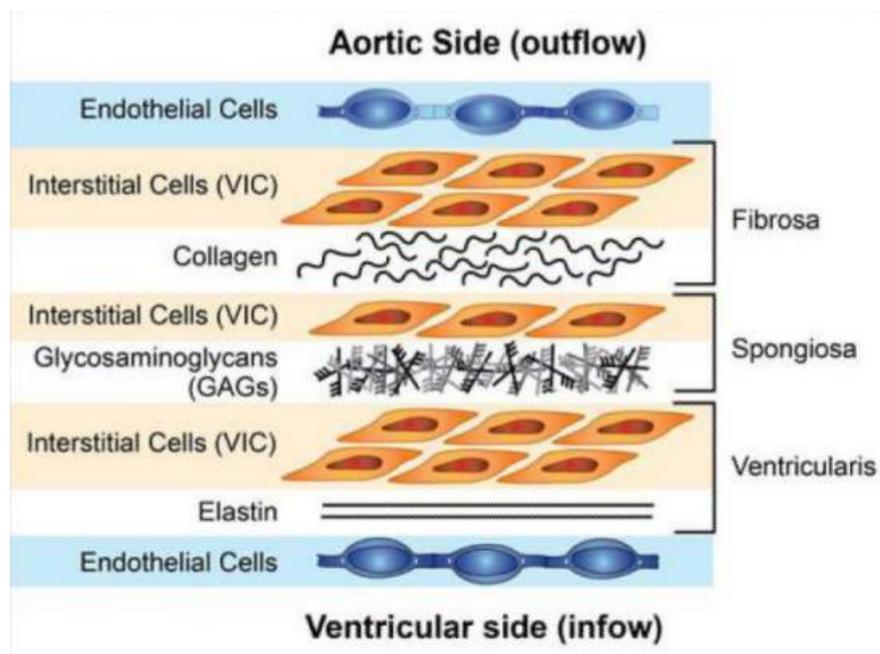


Figure 6 : Structure normale de la valve et types cellulaires résidents (Nalini M. Rajamannan et al., 2011)[2]

Les structures valvulaires ont un mouvement coordonné qui maintient le flux sanguin unidirectionnel pendant le cycle cardiaque. Ils travaillent ensemble pour résister aux modifications du débit hémodynamique au cours du cycle cardiaque [98]. Les composants de

la valve aortique sont synthétisés et maintenus par les cellules présentes au sein des feuillets, les hVECs et les hVICs.

Les hVECs sont phénotypiquement différentes des cellules endothéliales de l'aorte adjacente [99]. Une étude qui compare l'expression des gènes par les cellules endothéliales valvulaires et des cellules endothéliales vasculaires aortiques porcines a démontré des différences entre ces 2 types de cellules cultivées *in vitro*. Parmi les 847 gènes étudiés, 55 gènes ont une expression similaire entre les deux types de cellules, mais 48 gènes ont été exprimés par un seul type de cellule ou l'autre. Les gènes exprimés par les deux types de cellules comprenaient ceux impliqués dans la signalisation paracrine y compris le TGF- β 1, BMP-7 et -9 et le facteur de croissance des fibroblastes-3, le β -actine et la protéine d'interaction cellule-cellule cadhérine-11. Les gènes qui sont exprimés par les cellules endothéliales (CE) vasculaires uniquement comprenaient certaines protéines de la signalisation paracrine tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire-B et la molécule d'adhérence des cellules vasculaires-1, alors que les hVECs exprimaient le facteur de croissance du tissu conjonctif et l'interleukine chimiotactique des lymphocytes T-16, gènes impliqués également dans la signalisation paracrine [100]. Par ailleurs, Il existe également des différences fonctionnelles entre les hVECs et les CE vasculaires. Par exemple, la perméabilité des hVECs est supérieure à celle des CE des artères, ce qui permet d'expliquer l'observation de certaines régions de développement des lésions au début de la progression de la maladie [101].

Les hVECs ont un rôle d'interaction avec les hVICs pour maintenir l'intégrité de la valve en formant une barrière qui protège les hVICs contre le flux sanguin. Les hVECs peuvent en effet détecter les forces hémodynamiques et répondre aux facteurs sanguins circulants de manière à réguler de façon paracrine l'activité des hVICs. Les hVECs peuvent alors contribuer également aux processus physiopathologiques dans certaines conditions hémodynamiques (hypertension, étirement, contraintes de flux appelé « *shear stress* ») ou inflammatoires anormales [99].

Les hVICs sont les cellules majoritairement retrouvées dans les 3 feuillets, mais leur répartition est inégale, avec une présence plus importante dans la *fibrosa* et une densité cellulaire plus faible dans la *spongia*. Elles jouent un rôle majeur dans la synthèse de la MEC en exprimant des enzymes pouvant réguler la composition de cette matrice, notamment les métalloprotéinases [MMPs] et leurs inhibiteurs [TIMPs]. Les hVICs peuvent présenter 5

phénotypes (**Figure 7**) : hVICs progéniteurs embryonnaires endothéliaux/mésenchymateux, hVICs quiescents (qVICs), hVICs activés (aVICs), hVICs progéniteurs (pVICs) et les hVICs ostéoblastiques (obVICs).

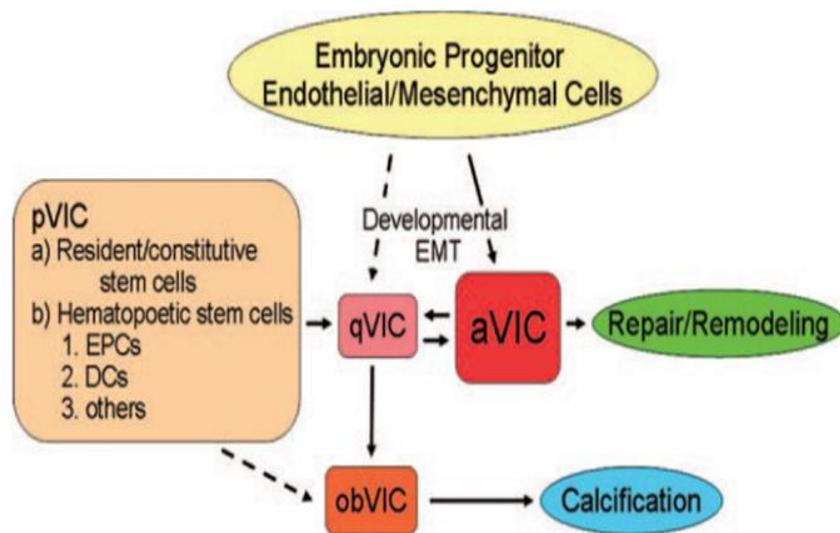


Figure 7 : Les différents phénotypes des cellules valvulaires (Amber C Liu et al., 2007)[8]

Les hVICs progéniteurs embryonnaires endothéliaux/mésenchymateux ont subi une transformation endothéliale-mésenchymateuse (TEM) qui initie le processus de formation des valves dans l'embryon [8].

Les hVICs progénitrices (pVICs) sont des cellules souches valvulaires provenant de cellules dérivées de la moelle osseuse, de cellules circulantes et ou de cellules progénitrices valvulaires résidentes. Ces cellules peuvent présenter des caractéristiques de cellules progénitrices endothéliales (CPE) ou de cellules dendritiques (CD). Les CPE présentent les marqueurs de cellules souches, tels que le CD133 et le CD34, et ont la capacité de prolifération et d'angiogénèse. Les CD sont identifiées par S100, une protéine de liaison au calcium intracellulaire. Par ailleurs, les pVICs présentent des marqueurs des cellules endothéliales et mésenchymateuses et répondent à la fois au TGF-b et au VEGF, le premier favorisant la transformation mésenchymateuse et l'autre donne naissance à l'endothélium. Ce qui reflète la plasticité importante de ces cellules [8]. Les pVICs peuvent être activées directement ou nécessitent une transformation par une étape qVICs.

Les qVICs sont les cellules présentes dans la valve adulte avec pour rôle de maintenir la structure et la fonction physiologiques des valves. Les qVICs présentent deux types de jonctions intercellulaires, les jonctions lacunaires et les jonctions d'adhésion. Les connexines-26 et -45 sont des protéines transmembranaires des jonctions lacunaires utilisées par les hVICs pour communiquer avec les hVICs adjacentes. Les jonctions d'adhésion cellule-cellule peuvent être importantes pour former un réseau structurel cellulaire qui transmettent rapidement les informations afin de faciliter la fonction de la valve [102]. Dans la valve normale, les cellules sont considérées comme étant au repos.

Les aVICs sont les cellules qui régulent les réponses de la valve en cas de maladie et de blessure. Dans les valves malades, les signaux cellulaires favorisent la transformation des qVICs en des hVICs activées. Les aVICs présentent des caractéristiques de myofibroblastes montrant une contraction accrue, avec une expression importante des protéines contractiles, telles que le α -SMA. En culture primaire, avec un nombre croissant de passages, de nombreuses hVICs deviennent positives pour α -SMA. En outre, les aVICs rondes et rhomboïdes ont plus de fibres de stress contenant du α -SMA et sont moins mobiles. À l'inverse, les aVICs à queue et en forme de fuseau (allongées) sont plus prolifératives et sont plus mobiles. L'activation des hVICs est associée à une augmentation de la sécrétion et de la dégradation de la MEC, à l'expression des MMPs et des TIMPs, ainsi qu'à une prolifération et une migration accrues, qui sont toutes des caractéristiques importantes du processus de remodelage [103].

Les obVICs désignent les hVICs qui subissent une différenciation ostéoblastique et favorisent la calcification, comme on le voit lorsque les hVICs sont cultivées dans un milieu de culture ostéogénique. Ces cellules expriment des protéines associées à l'ostéogénèse, tels que l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse, la phosphatase alcaline et la protéine morphogénétique osseuse BMP-2 et-4 [8].

La répartition de ces différents phénotypes peut varier selon l'état de la valve. Normalement, lorsque la valve est saine, la majorité des hVICs est en état quiescent avec une sous-population limitée de cellules présentes sous la forme de progéniteurs ou « osteoblast-like ». Lors des processus physiopathologiques, la présence de progéniteurs embryonnaires de hVICs et de sous-populations ostéoblastiques peut contribuer aussi bien à la réparation des lésions valvulaires qu'à leur calcification [7]. Le (**Tableau 2**) présente les différents types cellulaires présents dans la valve et leurs fonctions.

Tableau 2 : Les différents phénotypes de hVICs et leurs fonctions (Rajamannan et al, 2011)[2]

Cell type	Location	Function
Embryonic progenitor endothelial/mesenchymal cells	Embryonic cardiac cushions	Give rise to resident qVICs, possibly through an activated stage. EMT can be detected by the loss of endothelial and the gain of mesenchymal markers
qVICs	Heart valve leaflet	Maintain physiologic valve structure and function and inhibit angiogenesis in the leaflets
pVICs	Bone marrow, circulation, and/or heart valve leaflet	Enter valve or are resident in valve to provide aVICs to repair the heart valve, may be CD34-, CD133-, and/or S100-positive
aVICs	Heart valve leaflet	α -SMA-containing VICs with activated cellular repair processes including proliferation, migration, and matrix remodeling. Respond to valve injury attributable to pathological conditions and abnormal hemodynamic/mechanical forces
obVICs	Heart valve leaflet	Calcification, chondrogenesis, and osteogenesis in the heart valve. Secrete alkaline phosphatase, osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein

In vitro, plusieurs études suggèrent que lorsque les hVICs sont mises en culture et après plusieurs passages elles sont activées et se transforment en aVICs. Cependant, plus de connaissances sont nécessaires pour évaluer l'effet des conditions de culture y compris le nombre de passages et la densité de culture sur la transformation phénotypique des hVICs. En outre, les hVICs dans les cultures monocouches montrent une forme allongée (en forme de fuseau) qui ressemble à des fibroblastes. Cependant leur morphologie peut changer sous l'effet de la densité cellulaire (**Figure 8**)[8].

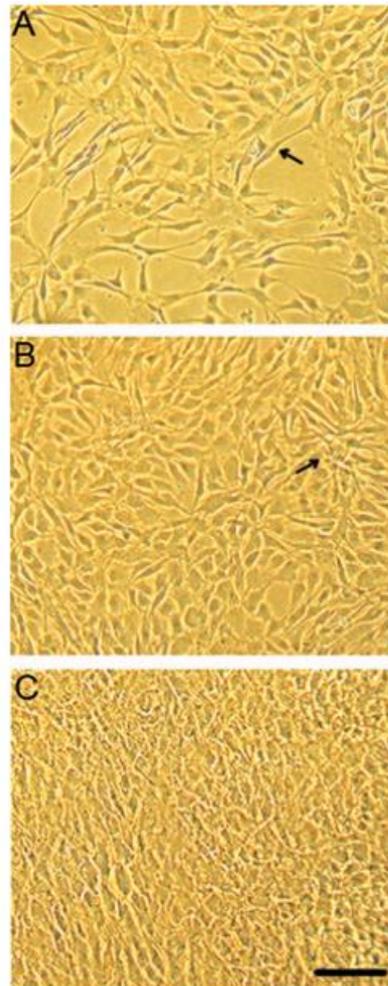


Figure 8 : Les hVICs en culture monocouche (Amber C Liu et al., 2007)

à des densités modérées (A), confluentes (B) et super confluentes (C). Barre d'échelle 20 μ m.

Grossissements x200.

La calcification de la valve peut alors être associée à une dégénérescence et une rigidification liées à une transition phénotypique des cellules en plus des mécanismes cellulaires et moléculaires qui compromettent finalement sa fonctionnalité. Dans le cas du RAC, la valve aortique accumule de façon progressive des dépôts importants de calcium sous forme d'hydroxyapatite qui l'empêche de s'ouvrir complètement et constitue un véritable obstacle au flux sanguin. Les valves aortiques calcifiées récupérées après remplacement valvulaire chirurgical montrent en effet une métaplasie osseuse (formation d'os) importante [104][105][106].

2.2. Voies moléculaires conduisant à la calcification

Plusieurs voies moléculaires participent au développement de la pathologie calcifiante; celles-ci incluent notamment la voie RANK (activateur du récepteur du facteur nucléaire kappa B)/RANKL (ligand RANK)/OPG (ostéoprotégérine), la voie Wnt / β -caténine et la voie Notch, particulièrement impliquées en temps normal dans le métabolisme osseux [107].

Dans l'os, RANKL (membre de la famille des cytokines TNF) se lie à RANK, un récepteur transmembranaire impliqué dans la différenciation des ostéoclastes, ce qui entraîne la déminéralisation de l'os. Cependant cette activation pourrait être empêchée par l'ostéoprotégérine (OPG), un récepteur soluble ayant la capacité de lier RANKL et inhiber ainsi l'activation de RANK (**Figure 9**).

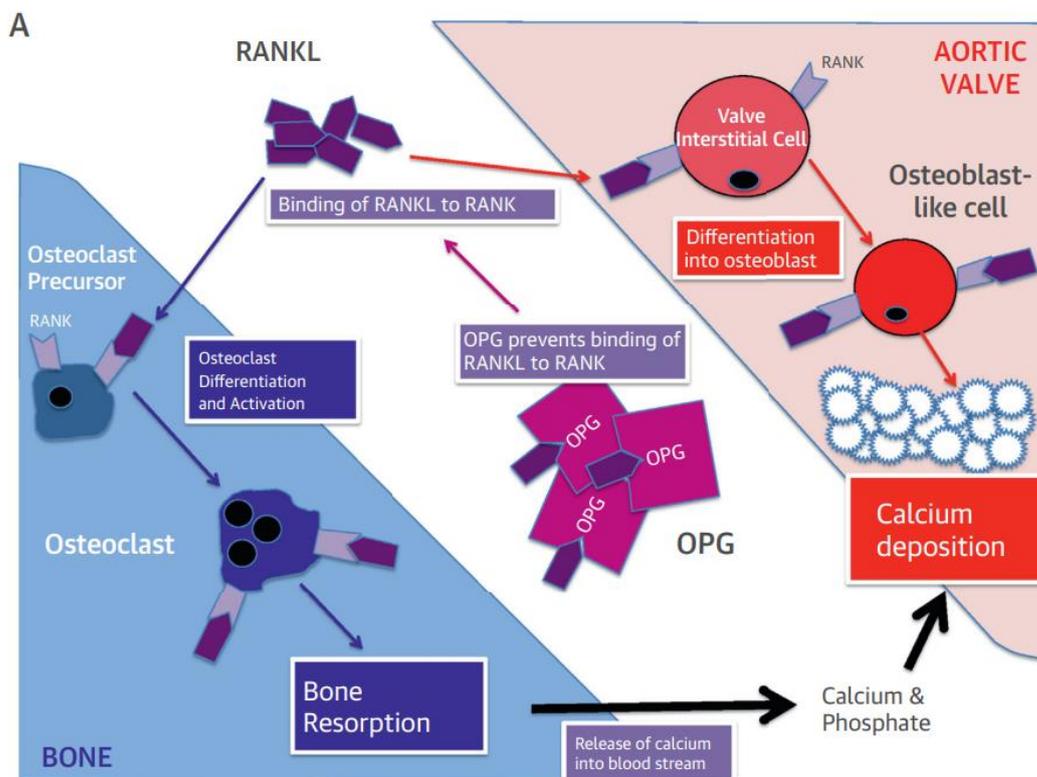


Figure 9 : L'effet de la voie RANK/RANKL/OPG dans le tissu osseux et valvulaire (Tania

A. Pawade et al., 2015)[9]

En revanche, un effet inverse de RANKL a été observé dans le système cardiovasculaire, où RANKL peut se lier sur son récepteur exprimé par les hVICs ce qui déclenche un changement phénotypique de type ostéoblastique. Ce phénotype se traduit par l'augmentation de l'expression de certaines protéines comme la phosphatase alcaline, le BMP2, et l'ostéocalcine qui favorisent la calcification de la MEC et la formation de nodules calcifiées [108]. Cet effet distingué entre l'os et le système cardiovasculaire est expliqué par le fait que dans l'os, la charge de pré-ostéoclastes est importante ce qui induit un effet pro-ostéoclastique de RANKL. Par contre, dans le système cardiovasculaire on ne retrouve pas ce pool de pré-ostéoclastes ce qui déclenche, à l'inverse, un effet pro-ostéoblastique de RANKL [109]. Il a été démontré que dans les valves aortiques calcifiées la signalisation RANK/RANKL/OPG est perturbé. Chez des patients atteints de sténose valvulaire aortique, l'analyse immuno-histochimique montre une diminution de l'expression de l'OPG dans les zones calcifiées des valves. Conformément à ce résultat, le Western blot montre que le niveau d'expression de l'OPG est beaucoup plus faible chez les patients atteints de sténose aortique par comparaison avec les sujets témoins. L'inverse a été observé pour RANKL qui montre une expression importante chez les sujets atteints de sténose aortique [108].

D'autres inhibiteurs de la calcification peuvent être également réprimés au cours du RAC : la fétuine-A et la MGP. Il existe deux formes de fétuine-A : une forme libre et une forme complexée avec la MGP. Les deux formes sont des inhibiteurs puissants de la calcification [110]. L'activation de la MGP est un mécanisme dépendant de la vitamine K et nécessite sa carboxylation et sa phosphorylation. Il a été démontré que l'utilisation de la warfarine, un antagoniste de la vitamine K, induit une augmentation de la calcification [111]. La fétuine-A et la MGP peuvent agir en inhibant la BMP2 et le TGF- β . De plus, ils peuvent agir directement en se liant aux cristaux de calcium pour inhiber leur croissance. Une étude intéressante a montré que la concentration plasmatique de fétuine-A diminue chez les patients atteints de sténose aortique et est inversement corrélée au taux de progression de la maladie [112][113]. Cette corrélation a été observée uniquement chez les patients âgés (> 70 ans). À l'inverse, l'augmentation de la concentration plasmatique de la forme inactive de MGP (MGP déphosphorylée) était associée à une progression plus rapide de la calcification, mais cette association est observée uniquement chez les patients plus jeunes (<57 ans) [114].

D'autre part, la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle régulateur positif de la différenciation ostéoblastique, dans laquelle la liaison de Wnt au LRP5 (la protéine liée au récepteur LDL 5) conduit à l'activation de la voie canonique Wnt/ β -caténine. Suite à

l'activation de celle-ci, des dépôts calciques formés provoquent un raidissement des cuspidés, ce qui augmente la contrainte mécanique et induit davantage l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, conduisant finalement à une différenciation ostéoblastique accrue des hVICs [106].

D'autres voies semblent aussi participer au processus physiopathologique, comme la voie impliquant le facteur de transcription Notch1. Normalement, Notch1 inhibe l'expression de BMP-2 ainsi que l'activité transcriptionnelle du Runx2, protégeant ainsi les hVICs de la différenciation ostéoblastique. Cependant, des mutations du gène codant pour cette protéine provoquent un défaut de développement précoce de la valve aortique et un développement progressif du RAC [115].

Quels que soient les stimuli, l'induction de gènes ostéogéniques aboutit finalement à une voie commune d'ossification de la valve aortique. En particulier, l'inflammation est l'une des causes de l'induction de gènes ostéogéniques par le biais de la libération de certaines cytokines, par exemple le TNF α et l'IL6 [116], ainsi que la génération du stress oxydatif, qui activent les cascades de signalisation Runx2 et Msx2/Wnt [117]. Un autre mécanisme important par lequel l'inflammation favorise la sténose aortique est la formation des vésicules matricielles favorisant la minéralisation. Par exemple, la cytokine pro-inflammatoire S100A9 est impliquée dans la sécrétion des vésicules matricielles à partir de macrophages par la formation du complexe phosphatylsérine-annexine 5- S100A9-hydroxyapatite [118].

2.3. Communication intercellulaire au cours du RAC et rôle des vésicules extracellulaires

Plusieurs types cellulaires communiquent entre eux au cours de la progression du RAC et peuvent ainsi affecter le changement phénotypique et l'activité de certaines cellules [119]. Des expériences de cocultures des hVICs avec les hVECs montrent que la transition endothéliale-mésenchymateuse (TEM) des hVECs est bloquée en présence des hVICs. En outre, l'activation des hVICs *in vitro* est également inhibée par des hVECs [120]. La communication intercellulaire VIC-VEC assure une architecture normale de la MEC ; une caractéristique essentielle d'une valve aortique saine. En revanche, dans certaines conditions pathologiques, le dysfonctionnement des hVECs induit l'activation des hVICs. Cette activation déclenche leur prolifération et la désorganisation de la MEC, aboutissant ainsi à un durcissement de la valve [121]. Donc d'après ces données en plus d'autres études menées

dans le même sens, la communication intercellulaire entre les hVECs et les hVICs est essentielle au cours de la valvulopathie et la valvulogénèse [122].

Les hVICs peuvent interagir avec les hVECs par le biais de vésicules extracellulaires (VE). Une interaction intercellulaire se produit par exemple lorsque les hVECs absorbent les VE dérivées des hVICs [123]. Les cellules endothéliales elles-mêmes ainsi que les monocytes/macrophages peuvent aussi libérer des VE et agir sur les hVICs au cours de la calcification de la valve aortique [124]. Ces VE véhiculent des ARN, des protéines solubles et des lipides, représentant leur cellule parentale (**Figure 10**) [125]. En présence de concentrations élevées de calcium et de phosphate, les hVICs génèrent par déformation mécanique des VE pro-calcifiantes [120]. Les VE sont aussi enrichies en MMPs matricielles qui interviennent dans le remodelage de la MEC [126][10]. En outre, des études montrent que plusieurs ectonucléotidases comme l'ALP, l'ectonucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase membre de la famille 1 (E-NPP 1) et 50-nucléotidase (50-NT, également appelé CD73) sont impliquées dans la nucléation du calcium et du phosphate et aggravent le développement des nodules calcifiées [127][128]. Des transporteurs présents sur les vésicules facilitent l'entrée du Ca^{2+} . La phosphatase alcaline non spécifique (TNAP) convertit le pyrophosphate (PPi) en ions phosphate (Pi) et les transporteurs PiT-1 transfèrent le Pi dans la lumière des VE. Ainsi, la coïncidence de ces ions et la formation de complexes Ca^{2+} -Pi associés aux lipides membranaires tels que la phosphatidylsérine (PS) dans la VE initient le processus de minéralisation.

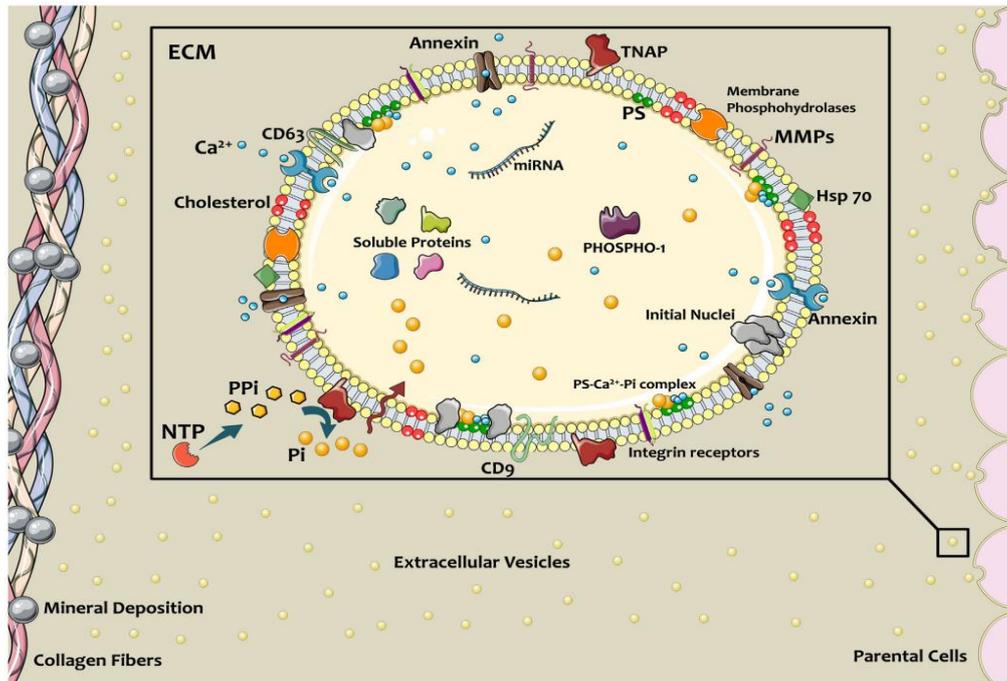


Figure 10 : Schéma des vésicules extracellulaires (VE) contribuant à la minéralisation
(Bakhshian Nik et al., 2017)[10]

2.4. Remodelage de la MEC dans une valve aortique sténotique

Le remodelage anormal de la MEC est une caractéristique essentielle du RAC. La fibrose associée au dépôt calcique entraîne un épaississement progressif de la valve, induisant des altérations importantes du fonctionnement de la valve (**Figure 11**) [11].

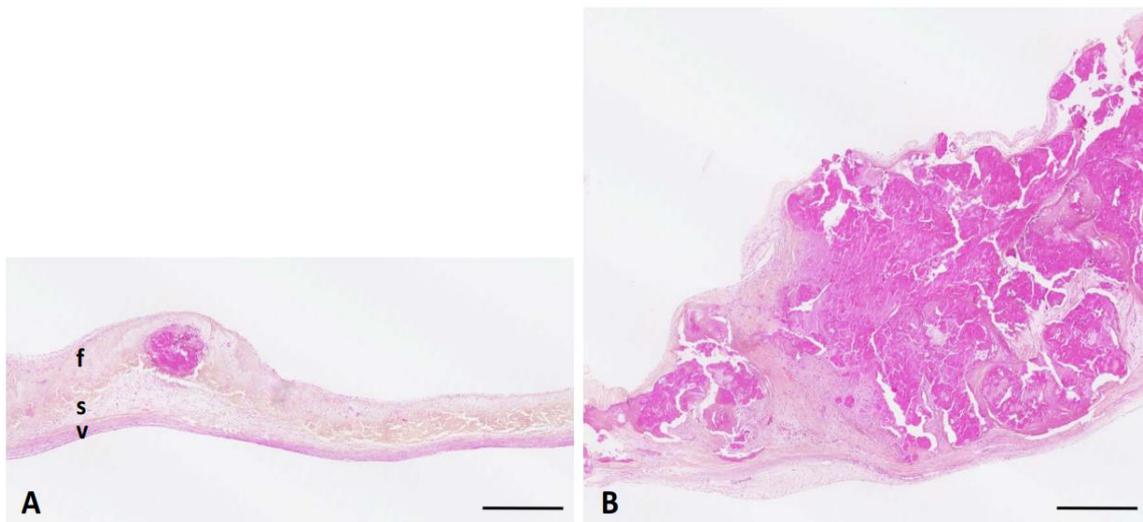


Figure 11 : L'épaississement de la valve aortique au cours du RAC (Najlah Kochtebane et al., 2012)[11]

(A) Valve aortique au début de la calcification. (B) Valve aortique calcifiée. f, fibrosa ; s, spongiosa ; v, ventricularis. Coloration Hématoxyline-Phloxine-Safran. Barre : 0,5 mm

La fibrose de la valve ainsi que l'épaississement qui en résulte sont causés par une modification des composants de la MEC. En effet, les fibres de collagène sont produites de façon importante mais sont mal organisées [129]. Une synthèse excessive des PG et des GAG est également observée. Ces composants de la MEC ont la capacité de retenir l'eau, le TGF β et les lipides, ce qui aggrave l'infiltration des cellules inflammatoires et augmente la calcification [130]. Par ailleurs, au cours du RAC, on assiste à une fragmentation des fibres d'élastine qui deviennent désorganisées (**Figure 12**)[131].

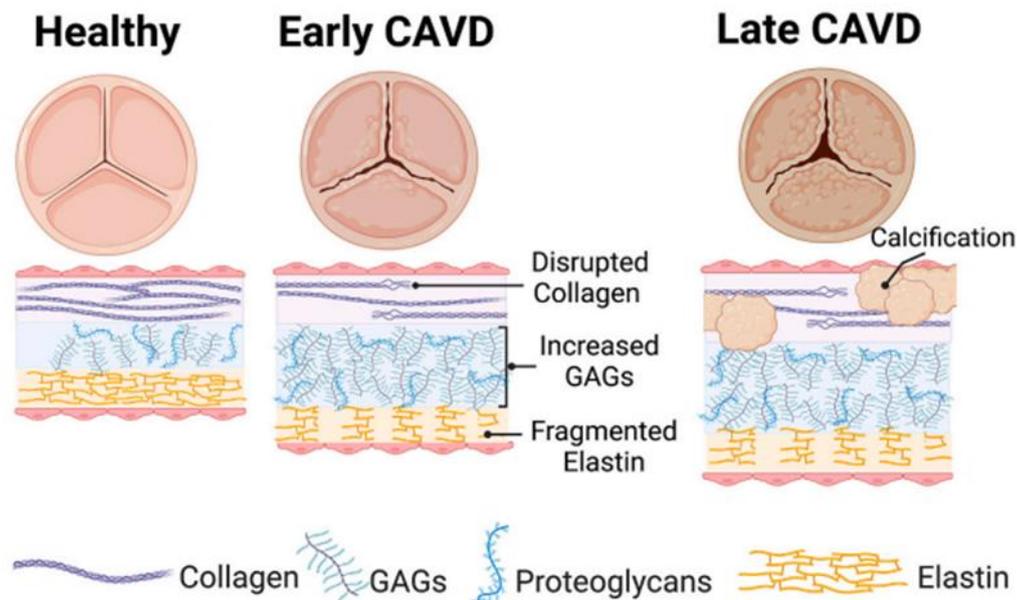


Figure 12 : Modifications des composants de la MEC au cours du RAC (Ashley J. Scott et al., 2021)[12]

Les cellules produisent initialement un précurseur de l'élastine nommé proélastine qui est ensuite clivée et libéré dans l'espace extracellulaire sous forme de tropoélastine. Dans la MEC, l'organisation des fibres élastiques nécessite une interaction de la tropoélastine avec d'autres composants de la matrice : fibrilline 1, fibrilline 2 et fibuline 1. La production d'élastine est limitée à la vie embryonnaire et la petite enfance. Les fibres élastiques sont considérées comme l'élément le plus durable de la MEC. La demi-vie des fibres d'élastine est d'environ 40 années [132]. Les fibres élastiques sont pourtant dégradées avec l'âge et dans des conditions pathologiques [133]. Plusieurs études suggèrent que l'élastine est impliquée dans le développement des calcifications cardiovasculaires [134][121]. Par exemple, dans des modèles murins du syndrome de *Marfan*, un défaut du gène de la fibrilline-1 peut provoquer une calcification des fibres élastiques [135]. Au cours du RAC, la gravité de la calcification a été proportionnellement liée à une augmentation progressive de la fragmentation de l'élastine [136][137].

Par ailleurs, une forte augmentation des cathépsines et des métalloprotéinases matricielles a été rapportée dans le RAC et semblerait nécessaire au remodelage et à la calcification valvulaire [138]. Les cathépsines (S/K/V) et certaines métalloprotéases,

comprenant la gélatinase A (MMP-2), la matrilysine (MMP-7), la gélatinase B (MMP-9) et la macrophage élastase (MMP-12), sont des enzymes ayant une activité élastase pouvant participer au remodelage de la MEC des valves en favorisant la fibrose et/ou en augmentant la dégradation des fibres élastiques (**Figure 13**) [139][129][138].

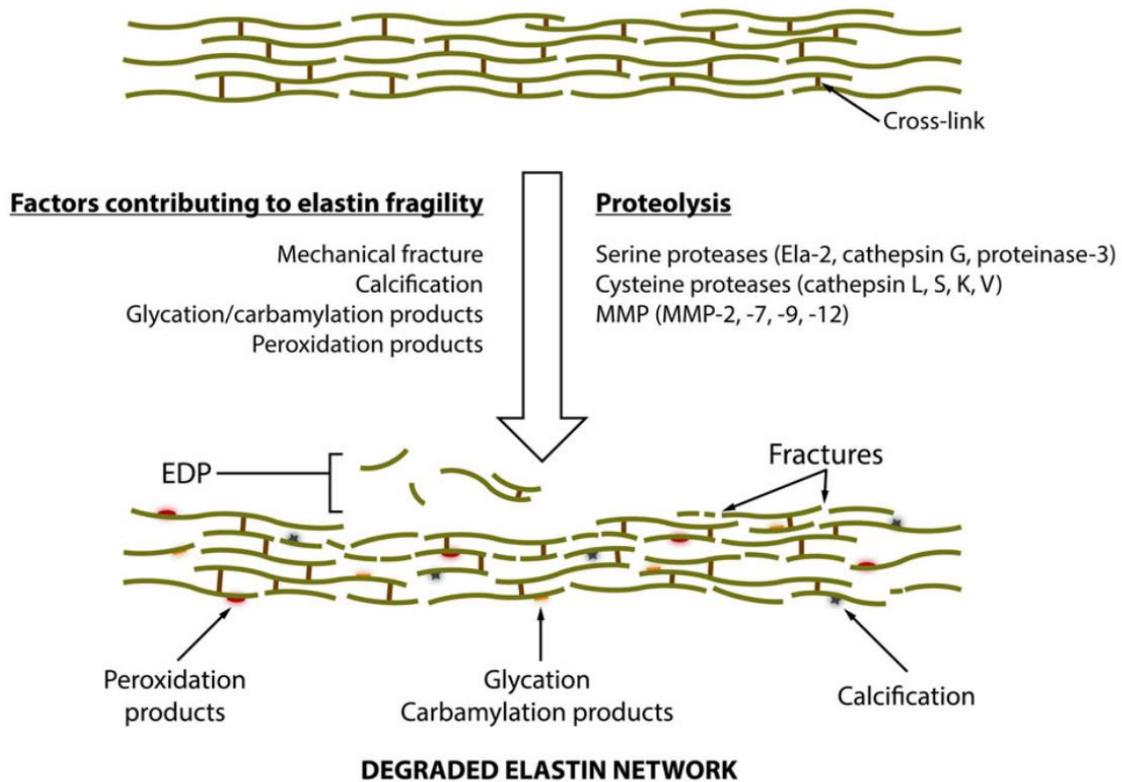


Figure 13 : Mécanisme de remodelage de l'élastine (Laurent Duca et al., 2016)[13]

Ela-2, élastase neutrophile; MMP, matrice métalloprotéinase; EDP, peptides dérivés de l'élastine

Il a été observé que des MMPs (surtout MMP-2 et -9) sont exprimées à un stade précoce de la calcification et que l'inhibition de ces MMPs a induit une diminution importante de l'expression d'élastine et de la calcification [140]. Une autre étude intéressante menée par Bailey et al. a montré que l'implantation d'élastine en sous-dermique chez les rats provoque une calcification progressive par un mécanisme impliquant l'activation des MMPs (MMP-2, MMP-9) [141]. En outre, dans les valves aortiques sténotiques, un déséquilibre

entre les MMPs et leurs inhibiteurs favorise le remodelage de la MEC en déséquilibrant la balance entre synthèse des composants de la matrice et leur dégradation [11].

Par ailleurs, la dégradation de l'élastine par les élastases génère des peptides dérivés de l'élastine (PDE) nommés matrikines. Les matrikines ont pour rôle d'augmenter la polarité des fibres élastiques, ce qui améliore leur affinité pour le calcium formant ainsi un nid pour le dépôt et la croissance des cristaux. Elles ont de plus un rôle biologique qui se manifeste par leur capacité à induire la transition ostéogénique des cellules valvulaires et à promouvoir le recrutement des cellules inflammatoires [142][143], mais ces fonctions sont surtout documentées au niveau vasculaire (**Figure 14**).

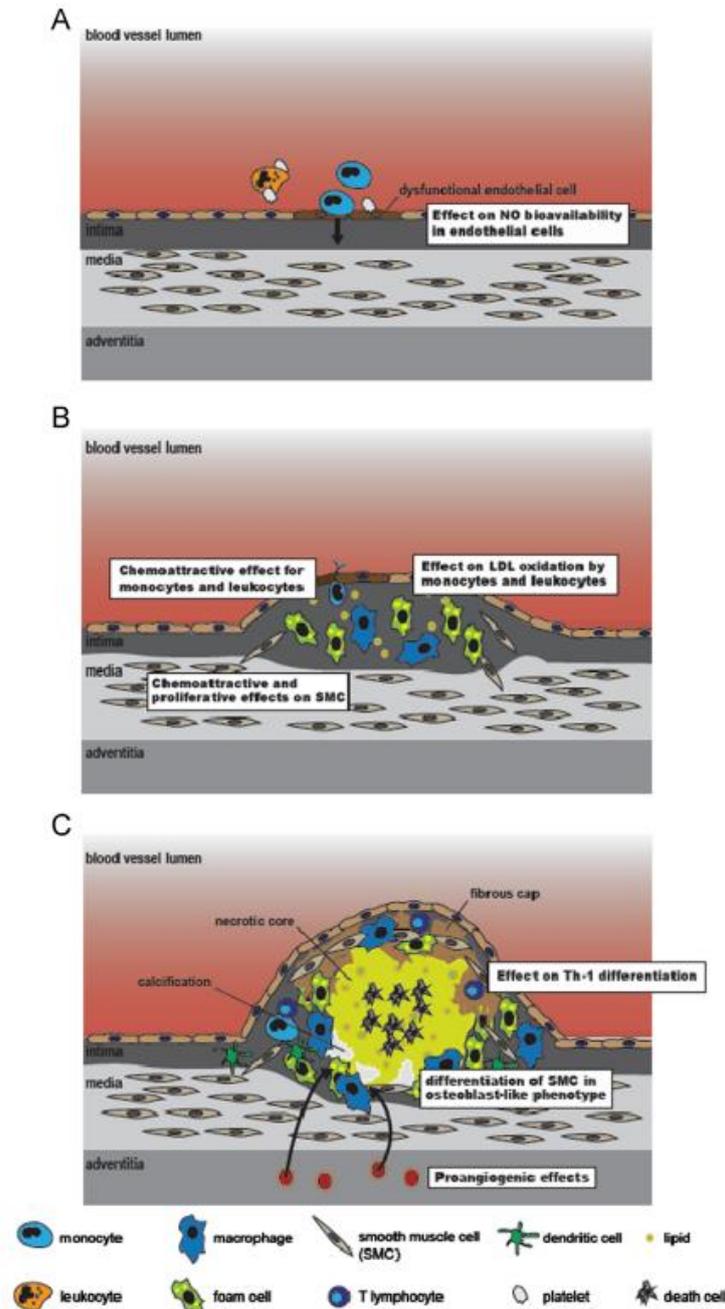


Figure 14 : Effets des matrikines produites localement au cours de la progression de la calcification (Pascal Maurice et al., 2012)[14]

Il a été démontré que les matrikines peuvent exercer un effet chimio attractif sur les monocytes et les leucocytes, des effets chimio attractifs et prolifératifs sur les CML et peuvent augmenter l'oxydation des LDL par les monocytes et les leucocytes. De plus, les matrikines induisent un phénotype ostéoblastique des CML, différencient les lymphocytes T présents dans la plaque vers les cellules Th-1 et exercent des effets pro-angiogéniques dans différents modèles d'angiogenèse. NO: oxyde nitrique; LDL: lipoprotéine de basse densité; CML : cellule musculaire lisse (SMC en Anglais); Th-1 : cellule T-helper-1.

2.5. Étapes du développement du RAC

Les étapes du développement du RAC et de l'athérosclérose sont très semblables. En effet et comme pour le développement de l'athérosclérose, le RAC peut être divisé en deux phases distinctes : la phase d'initiation et de propagation, chacune dominée par des mécanismes différents (**Figure 15**).

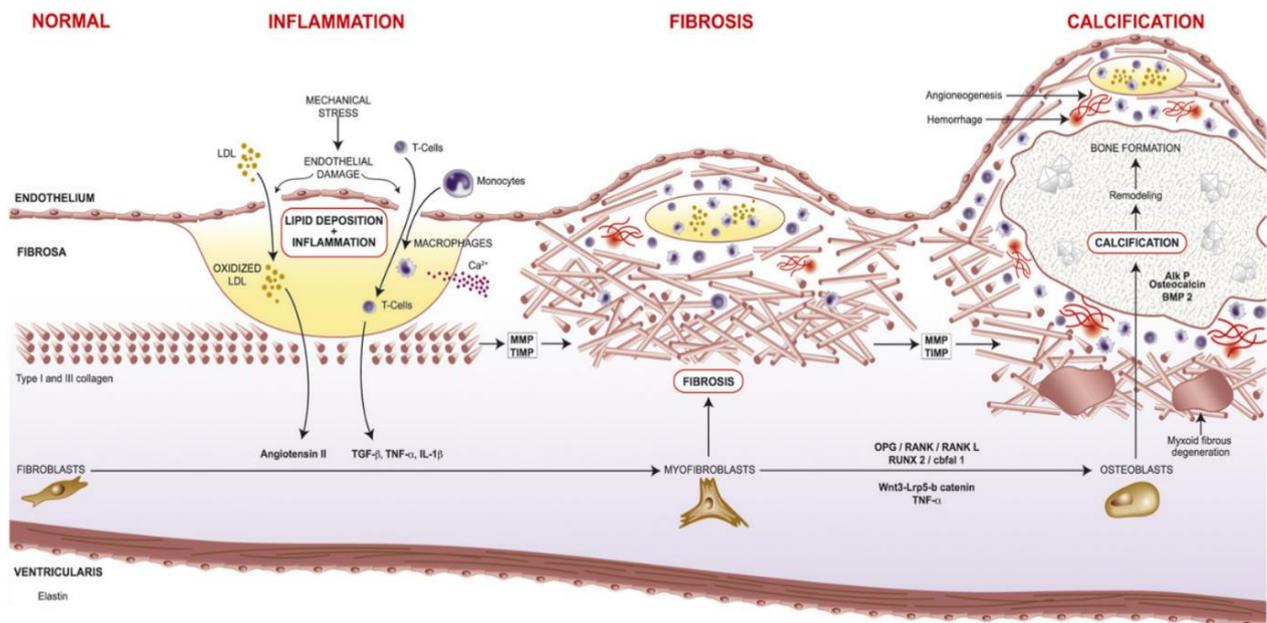


Figure 15 : Les différents mécanismes impliqués dans le développement de la sténose valvulaire aortique (Marc R. Dweck et al., 2012) [15]

a. La phase d'initiation

La phase d'initiation du RAC, comme celle de l'athérosclérose, est déclenchée par une lésion endothéliale qui induit une réponse inflammatoire. La lésion endothéliale de la valve aortique est généralement consécutive de contraintes mécaniques. Elle cause une infiltration lipidique et une oxydation des lipoprotéines qui génèrent des ox-LDL (lipoprotéines de basse densité oxydés) et de phospholipides oxydés qui peuvent être transformés en lysophosphatidylcholine favorisant l'apoptose des hVICs [144]. En outre, les ox-LDL stimulent l'expression des molécules d'adhésion cellulaire, en particulier ICAM-1 (molécule

d'adhésion intercellulaire 1) et VCAM-1 (protéine d'adhésion vasculaire 1), ce qui favorise l'adhésion et l'extravasation des cellules immunitaires (**Figure 16**) [145][16].

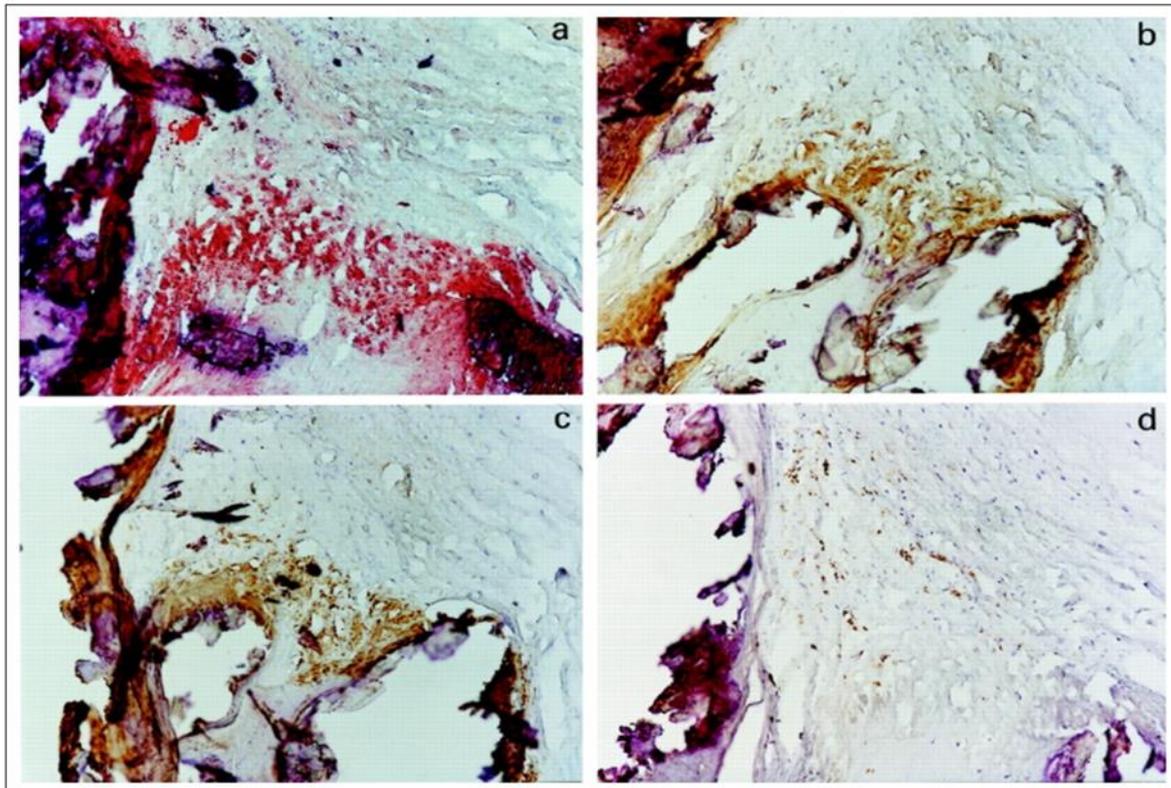


Figure 16 : Les régions calcifiées des valves sténótiques sont caractérisées par la présence des lipides et des cellules inflammatoires (M Olsson et al., 1999)[16]

Colocalisation des lipides (a), apoB (b), LDL oxydés (c), et des lymphocytes T (d) dans les régions calcifiées de la valve sténótique.

Ces ox-LDL favorisent également l'activation des macrophages locaux, des lymphocytes et des mastocytes [146], suite à l'activation du RRP (récepteur de reconnaissance des formes), tel que le TLR (récepteurs de type toll) et de la voie NFkB (facteur nucléaire kB) [147].

Les hVICs expriment les récepteurs TLR. En particulier, TLR2, TLR3 et TLR4 ont été impliqués dans la transition des hVICs vers un phénotype ostéogénique [148][17]. Ainsi, il a été montré que le traitement des hVICs par un activateur de TLR3 nommé Poly(I:C) induit l'expression du BMP-2, TGF- β 1 et ALP, et le dépôt *in vitro* de cristaux de calcium (**Figure 17**) [17].

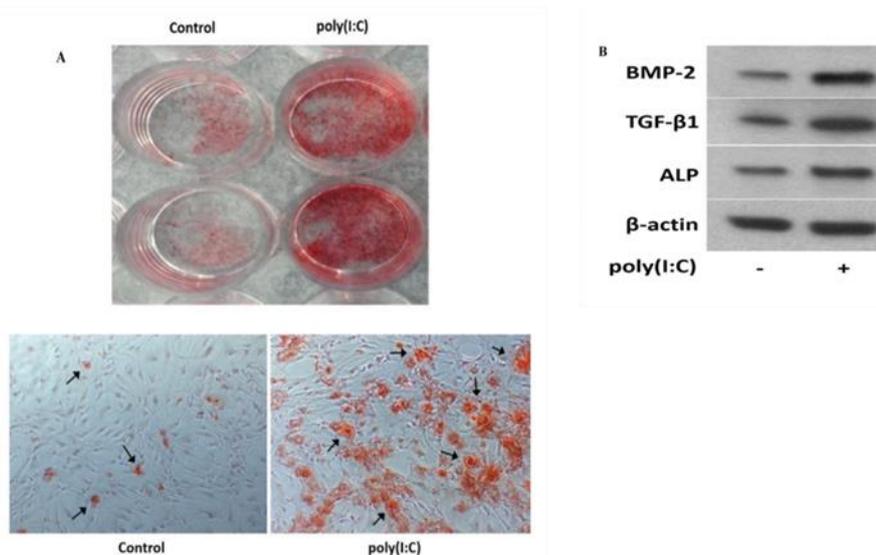


Figure 17 : L'activation du TLR-3 par le traitement des hVICs avec Poly(I:C) induit la formation de dépôts de calcium qui est associée à une différenciation ostéogénique des hVICs (Qiong Zhan et al., 2015)[17]

Les microcalcifications formées entraînent la libération de corps apoptotiques et de VE qui fonctionnent comme des sites de nucléation favorisant le dépôt de calcium et la formation des cristaux d'hydroxyapatite. Ces derniers accélèrent le développement du RAC en se développant rapidement (créant davantage de sites de nucléation pour le dépôt de nouveaux cristaux) et en aggravant la réaction inflammatoire [149].

b. La phase de propagation

Pendant la phase de propagation, le rôle des cellules inflammatoires et du dépôt de lipides deviendrait moins important laissant place à des mécanismes cellulaires favorisant la fibrose et l'accroissement des dépôts calciques. Il faut noter que la lésion endothéliale induite dans la phase d'initiation entraîne une diminution de l'expression de l'oxyde nitrique et une régulation à la hausse du système rénine-angiotensine (RAS), la génération d'angiotensine II (Ang II) et la régulation à la baisse de l'expression du récepteur AT1 de Ang II [150]. Ce mécanisme serait impliqué dans le développement d'une fibrose caractérisée par un dépôt de collagène. Pendant la phase de propagation et après l'initiation de la calcification, les

mécanismes pro-ostéogéniques impliquant les voies précédemment décrites telles que celles faisant intervenir Notch, RANK/RANKL/OPG, Wnt/b-caténine et BMP deviennent dominants aggravant finalement le dépôt calcique et le dysfonctionnement de la valve [9].

Ces deux stades décrits du développement du RAC montrent que la calcification est un processus actif initié par l'inflammation et entraînant à la fin une minéralisation. Le processus est progressif et pourrait être résumé ainsi (**Figure 18**) :

- Les monocytes pro-inflammatoires (1) sont recrutés sur un site de lésion endothéliale où les cellules endothéliales sont activées (EC) provoquant une expression accrue de molécules d'adhésion, telles que VCAM-1(2).
- Les macrophages activés libèrent des enzymes protéolytiques telles que des MMPs et des cathépsines et des cytokines inflammatoires (3).
- Ces facteurs stimulent la différenciation des hVICs (4) en ostéoblastes (6).
- L'activité ostéogénique de ces cellules entraîne la formation de microcalcifications associées à la libération de VE dans la matrice (7) ainsi que des corps apoptotiques (8).
- Ces micro-calcifications accumulées vont croître progressivement pour former des macro-calcifications (9) dans l'étape finale de la progression du RAC.

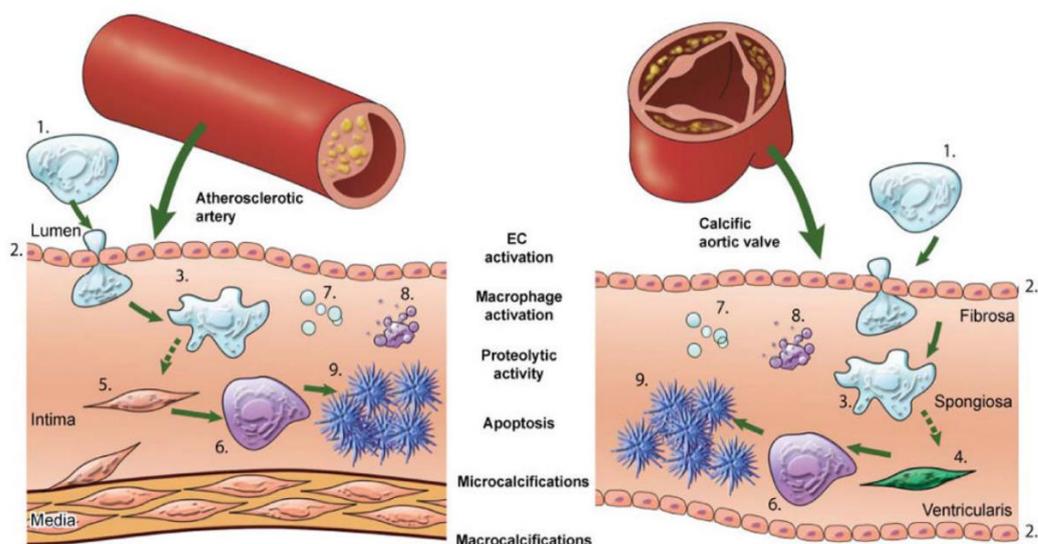


Figure 18 : *Etapes similaires de progression des calcifications vasculaires et valvulaires*

(Sophie E.P. New et Elena Aikawa, 2011)[18]

L'inflammation joue donc un rôle clé dans le RAC. En effet, il a été démontré que l'infiltration de macrophages est beaucoup plus importante dans les valves aortiques humaines calcifiées explantées que dans les valves aortiques humaines normales [151]. D'après l'imagerie moléculaire, l'infiltration de macrophages augmente avec la sévérité de la sténose aortique [152]. En outre, les valves aortiques humaines bicuspidées, plus susceptibles de calcifier que les valves tricuspides, montrent un pourcentage supérieur de macrophages valvulaires infiltrés en comparaison avec les valves tricuspides [153]. Les cellules inflammatoires contribuent à l'initiation et la propagation de la calcification de plusieurs manières : en sécrétant des MMPs impliquées dans la dégradation du collagène et de l'élastine de la MEC, en générant des VE pro-calcifiantes et en libérant des cytokines inflammatoires favorisant la transition ostéogénique des hVICs [154].

Parmi les cytokines inflammatoires, l'interleukine-8 (IL-8 ou CXCL-8) pourrait jouer un rôle important dans les calcifications cardiovasculaires. Un travail récent réalisé par l'équipe du laboratoire MP3CV à Amiens a montré que l'IL-8 pouvait amplifier la calcification des cellules musculaires lisses aortiques en condition urémique [155]. L'IL-8 est une chimiokine connue pour son rôle dans le chimiotactisme des leucocytes et se trouve de ce fait impliquée dans diverses pathologies cardiovasculaires ayant une composante inflammatoire mais son rôle dans le RAC n'est pas connu.

3. Interleukine 8 et maladies cardiovasculaires

3.1. Rappel sur les chimiokines

Les chimiokines sont des molécules impliquées dans le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires. Par définition, les chimiokines sont des petites protéines de 6 à 14 kDa comprenant quatre résidus de cystéine qui sont essentiels à leur intégrité structurelle. Ces chimiokines sont classées en quatre groupes différents selon la distribution de ces quatre résidus de cystéine: CC, CXC, XC et CX3C [156]. Il existe 50 ligands et 20 récepteurs de chimiokines identifiés à ce jour, avec les CC et CXC représentant les deux plus grandes classes de chimiokines (**Tableau 3**) [157]. Les CXC sont subdivisées en chimiokines ELR + ou ELR- selon la présence ou non d'un motif regroupant trois acides aminés (Glu [E]-Leu [L]-Arg [R]) précédant le premier résidu de cystéine présent sur l'extrémité N-terminale [4].

Tableau 3 : Différentes chimiokines et leurs récepteurs (Russo et al., 2014)[3]

Systematic name	Alternate human names	Human receptors
<i>CXCL1</i>	GRO- α , MGSA, GRO1, NAP-3	CXCR2, ACKR1/DARC
<i>CXCL2</i>	GRO- β , MIP-2 α , GRO2	CXCR2, ACKR1/DARC
<i>CXCL3</i>	GRO- γ , MIP-2 β , GRO3	CXCR2, ACKR1/DARC
<i>CXCL5</i>	ENA-78	CXCR2, ACKR1/DARC
<i>CXCL6</i>	GCP-2	CXCR1, CXCR2, ACKR1/DARC
<i>CXCL7</i>	NAP-2, CTAPIII, β -TG	CXCR1, CXCR2
<i>CXCL8</i>	IL-8, NAP-1, MDNCF, GCP-1	CXCR1, CXCR2, ACKR1/DARC
Systematic name	Alternate mouse names	Mouse receptors
<i>Cxcl1</i>	KC	CXCR2, ACKR1/DARC
<i>Cxcl2</i>	MIP-2	CXCR2, ACKR1/DARC
<i>Cxcl3</i>	DCIP-1	CXCR2, ACKR1/DARC
<i>Cxcl5</i>	LIX	CXCR1, CXCR2, ACKR1/DARC
<i>CXCL7</i>	NAP-2, CTAPIII, β -TG	CXCR1, CXCR2
Endogenous noncognate ligands	Names	Receptors
<i>PGP</i>	PGP	CXCR1, CXCR2
<i>MIF</i>	Macrophage MIF	CXCR2

MIF: Migration inhibitory factor; PGP: Proline-glycine-praline.

3.2. Caractéristiques générales de l'interleukine 8

CXCL8 est l'une des premières chimiokines étudiées et agissant comme un facteur pro-inflammatoire. À la fin des années 1980, *Peveri et al.* ont trouvé que les monocytes cultivés expérimentalement et stimulés par le LPS libèrent une protéine appelée facteur d'activation des neutrophiles (FAN) qui stimule la migration des neutrophiles [158]. En 1987, le FAN a été purifié, séquencé puis nommé interleukine-8 (IL8) puis CXCL8 [159][160][161]. En 1991, l'étude de la structure cristalline montre que CXCL8 est un peptide de 72 acides aminés avec trois brins β antiparallèles et une hélice α constituée des résidus C-terminaux 57-72 [162]. Cette structure est stabilisée par deux liaisons disulfure formées par Cys7-Cys34 et Cys9-Cys50 (**Figure 19**). Les deux résidus de cystéine (Cys7 et Cys9) sont séparés par un résidu (Gln8), expliquant la classification de cette chimiokine au sein de la classe CXC. La structure cristalline a également révélé que CXCL8 peut exister sous la forme d'un monomère ou d'un dimère stabilisé par des liaisons formées entre les hydrogènes du premier brin β .

Le gène codant pour CXCL8 ainsi que d'autres codant pour les membres de la famille de chimiokines CXC constituent un groupe de gènes « *cluster* » dans une région du chromosome 4q. Ce gène code pour une protéine initialement inactive de 99 acides aminés. Son activation nécessite un clivage en un peptide de 77 acides aminés dans les cellules non immunitaires ou en peptide encore plus court de 72 acides aminés dans les macrophages et les monocytes [163].

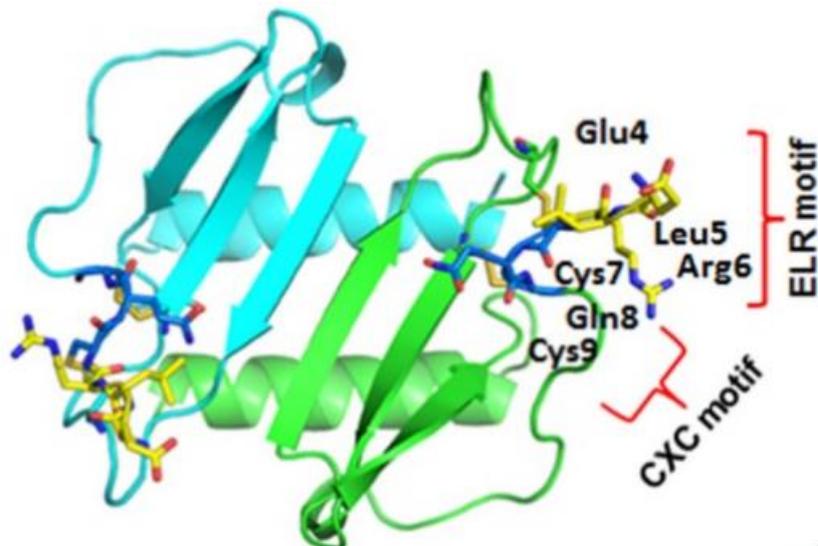


Figure 19 : Structure de la protéine CXCL-8 (Neamati et al., 2017)[19]

CXCL8 est sécrétée par différents types de cellules comprenant les monocytes/macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales [164][165]. CXCL8 n'est pas libérée par les cellules dans les conditions non pathologiques. L'expression est stimulée par la présence de plusieurs cytokines (interleukine-1/6, CXCL12 et TNF α), des espèces réactives de l'oxygène (ROS), une infection bactérienne ou autre stress, et contrôlée par des facteurs de transcription, le facteur NF κ B et la protéine activatrice-1(AP-1) [166][167].

3.3. Les récepteurs de l'IL-8 : CXCR1 et CXCR2

a- Caractéristiques générales

Les récepteurs de chimiokines CXC sont des membres de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G et sont exprimés sous forme de protéines intégrées à la membrane avec sept domaines transmembranaires, quatre domaines extracellulaires (N-terminal) et quatre domaines intracellulaires (C-terminal). Les récepteurs de chimiokines CXC ont plusieurs membres (CXCR1 à CXCR6), dont la plupart ont plusieurs ligands [168].

Deux membres sont considérés comme des récepteurs de l'IL-8: CXCR1 et CXCR2. Ces deux récepteurs peuvent être liés par CXCL8 avec une affinité similaire ($K_d \approx 4nM$). Toutefois, les monomères de CXCL8 se lient au récepteur CXCR1 avec une plus grande

affinité, alors que les monomères et les dimères de CXCL8 se lient à CXCR2 avec une affinité équivalente. Cette affinité variable entre CXCR1 et CXCR2 pour les monomères de CXCL8 par rapport aux dimères induit des signalisations différentes [169]. CXCR1 et CXCR2 partagent 76 % d'homologie de séquence entre eux. Les différences de structure entre ces deux récepteurs existent surtout dans la deuxième boucle extracellulaire, l'extrémité C-terminale (intracellulaire) et l'extrémité N-terminale [170][171][172]. CXCR2 interagit avec toutes les chimiokines ELR+. En revanche, CXCR1 n'a de ligands connus que CXCL6, CXCL7 et CXCL8 [173].

b- Expression de CXCR1/2

CXCR1 et CXCR2 sont exprimés par une grande variété de leucocytes comme les neutrophiles [159], les monocytes [174], les cellules T CD8+ [175], les mastocytes [176], et les basophiles [177]. Dans les leucocytes, la liaison de l'IL-8 sur ses récepteurs induit leur activation et favorise leur migration. Dans les neutrophiles, l'activation des récepteurs par l'ajout d'IL-8 induit également la libération de certaines enzymes (élastases) et d'espèces réactives de l'oxygène [178].

Les récepteurs de l'IL-8 sont aussi exprimés par des cellules non immunitaires notamment les kératinocytes [179], les fibroblastes [180], les neurones [181], les cellules endothéliales [182], les cellules épithéliales [183], les cellules musculaires lisses [184], les hépatocytes [185] et les mélanocytes [186] (**Tableau 4**). Dans ces cellules, l'activation de ces récepteurs peut induire plusieurs actions, en particulier l'angiogenèse et la croissance tumorale. En effet, plusieurs études ont montré que CXCL8 induit le chimiotactisme des cellules endothéliales *in vitro* ainsi que l'angiogenèse *in vivo* [187][182][188].

Tableau 4 : Les cellules exprimant les récepteurs d'IL-8(C Russo et al., 2014)[3]

Leukocyte population	Chemokine expression	Receptor expression
Neutrophils	CXCL1/GRO- α , CXCL2/GRO- β	CXCR1/CXCR2
Monocytes	CXCL1/GRO- α , CXCL8	CXCR1/CXCR2
T cells CD8 ⁺	CXCL8	CXCR1
Mast cells		CXCR1/CXCR2
Basophils		CXCR1/CXCR2
Natural killer cells		CXCR1/CXCR2
Myeloid-derived suppressor cells		CXCR1/CXCR2
Macrophages	CXCL5/ENA-78, CXCL8	
T cells	CXCL1/GRO- α , CXCL2/GRO- β , CXCL3/GRO- γ	CXCR1/CXCR2
Eosinophils	CXCL1/GRO- α , CXCL5/ENA-78	
Nonleukocyte population	CXC chemokine expression	Receptor expression
Keratinocytes	CXCL8	CXCR1/CXCR2
Fibroblasts	CXCL5/ENA-78, CXCL8	CXCR1/CXCR2
Epithelial cells	CXCL1/GRO- α , CXCL5/ENA-78, CXCL8	CXCR1/CXCR2
Hepatocytes	CXCL8	CXCR1/CXCR2
Synovial cells	CXCL8	
Endothelial cells	CXCL1/GRO- α , CXCL3/GRO- γ , CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL8	CXCR1/CXCR2
Neurons		CXCR1/CXCR2
Melanocytes		CXCR1/CXCR2
Smooth muscle cells	CXCL1/GRO- α , CXCL2/GRO- β , CXCL3/GRO- γ	CXCR1/CXCR2
Tumor cells	CXCL1/GRO- α , CXCL2/GRO- β , CXCL3/GRO- γ , CXCL8	CXCR2
Oligodendrocytes	CXCL1/GRO- α	CXCR2
Trophoblasts	CXCL2/GRO- β , CXCL3/GRO- γ , CXCL6/GCP-2, CXCL8	
Endometrial cells	CXCL2/GRO- β	

c- Activation de CXCR1/2 et voies de signalisation

Plusieurs études ont été réalisées pour comprendre les cascades de signalisation induites par l'activation des récepteurs CXCR1 et CXCR2. Plusieurs populations cellulaires, caractérisées par une surexpression de CXCR1 et/ou CXCR2, comprenant les neutrophiles, les cellules HEK293 et les cellules RBL-2H3 ont servi pour ces études.

CXCR1 et CXCR2 sont associés à la sous unité $G\alpha_i$ de la protéine G, ce qui permet la régulation de plusieurs voies de signalisation qui interviennent notamment dans l'activation des neutrophiles et leur chimiotactisme [189]. L'activation de CXCR1/2 après la liaison du ligand induit la dissociation de la protéine G et la libération des sous-unités $G\beta\gamma$ de la sous-unité $G\alpha$. Les sous-unités $G\beta\gamma$ libérées déclenchent l'activation de la phospholipase C (PLC) ce qui entraîne la libération du calcium depuis le réticulum endoplasmique vers le cytosol et l'activation de la protéine kinase C (PKC) (**Figure 20**) [190][191]. La libération de la sous-unité $G\alpha$ peut aussi entraîner une inhibition de l'enzyme adénylate cyclase (AC) qui a pour rôle de convertir l'ATP en AMP cyclique ; l'activation de CXCR1/2 peut donc induire une diminution de l'AMP cyclique intracellulaire [192].

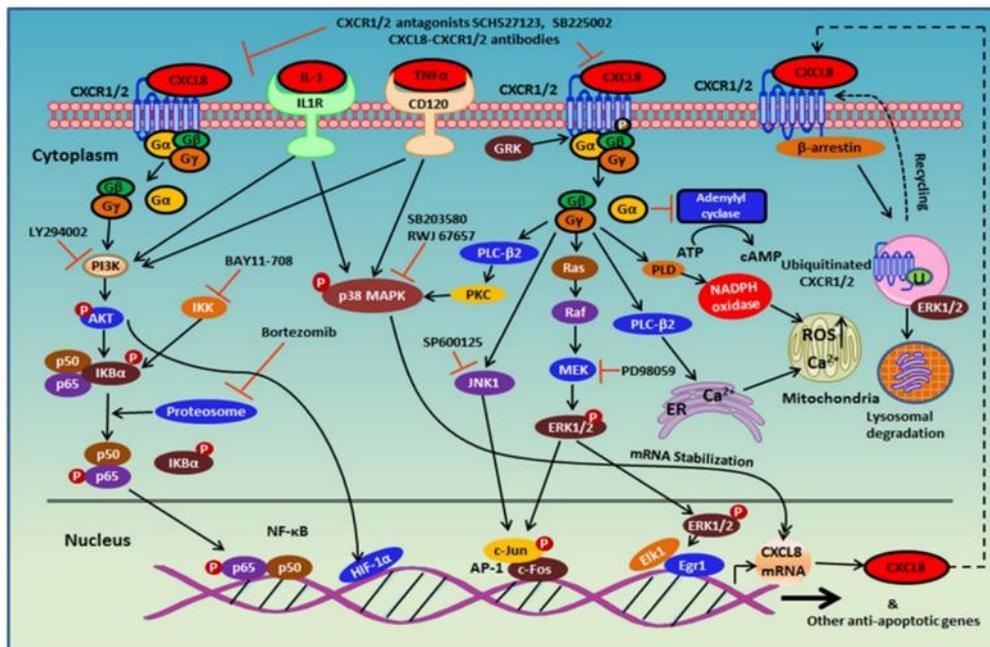


Figure 20 : Cascades de signalisation CXCL8-CXCR1/2 (Neamati et al., 2017)[19]

Des études sur les neutrophiles humains ont montré que CXCL8 induit également la phosphorylation des kinases ERK1/2 et de phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K)/Akt [193][194][195][196]. ERK1/2 sont des composants essentiels de la cascade de signalisation Ras-Raf-MEK-ERK, impliquées entre autres dans la prolifération et la différenciation cellulaire [197]. Cependant, les données sur le rôle de CXCL8 dans l'activation de ERK1/2

restent paradoxales. *Xythalis et al.* ont montré que le traitement avec D098059, un inhibiteur de MEK, prévient le chimiotactisme des neutrophiles induit par CXCL8, alors que d'autres études n'ont montré aucun effet de cet inhibiteur [193][194][195]. Par ailleurs, le traitement des neutrophiles humains et des cellules L1.2 surexprimant CXCR2 avec le LY294002, un inhibiteur de PI3K, réduit la migration cellulaire médiée par CXCL8, suggérant l'implication de la voie PI3K/Akt dans cette fonction [198].

En outre, CXCL8 peut activer les membres de la famille Rho GTPase et déclencher l'activation des protéines kinases telles que Src et la kinase d'adhésion focale (KAF). L'activation de KAF et Src par CXCL8 entraîne une augmentation de la prolifération et de la motilité cellulaire [199]. Par exemple, dans les cellules RBL (basophiles de rats leucémiques) transfectées avec CXCR1 et CXCR2, la stimulation par CXCL8 a déclenché la phosphorylation et la relocalisation de KAF ce qui permet la réorganisation de l'actine et de la β -tubuline et améliore la motilité et la migration des cellules [200][201]. CXCR2 peut également réguler d'autres éléments clés de la polymérisation de l'actine comme les Rac-GTPases (petites GTPases monomériques) [202].

d- Fonctions différentielles de CXCR1 et CXCR2

Les deux récepteurs partagent beaucoup des fonctions similaires notamment la libération du stock intracellulaire de calcium, l'induction de cascades de signalisation Ras/MAPK et PI3K, ainsi que l'internalisation des récepteurs et le chimiotactisme. Cependant, certaines fonctions spécifiques ont été décrites pour l'un des récepteurs et pas l'autre. Par exemple, CXCR1 contrairement à CXCR2, peut activer la PLD dans les neutrophiles [203][204]. La PLD convertit la phosphatidylcholine en acide phosphatidique et choline. L'acide phosphatidique active le NADPH oxydase et la libération d'anions superoxyde, ce qui suggère que CXCR1 serait essentiel dans le stress oxydatif médié par CXCL8 [205].

Une autre différence entre ces deux récepteurs concerne leur désensibilisation. La désensibilisation des récepteurs nécessite des concentrations plus élevées du ligand que leur activation. Comparativement à CXCR1, CXCR2 est activé avec de plus faibles concentrations de ligand et internalisé plus rapidement. Ceci est lié à une régulation différentielle de la signalisation induite par ces récepteurs [206]. En effet, les deux récepteurs sont phosphorylés par différentes kinases de type GRK (G protein-coupled receptor kinase).

CXCR1 est phosphorylé principalement par GRK2, alors que CXCR2 est phosphorylé par GRK6 [207]. Sur la base de l'affinité de CXCL8 pour CXCR1 et CXCR2 et des caractéristiques d'internalisation et de recyclage des récepteurs, il a été proposé que CXCR1 assure le chimiotactisme induit par CXCL8 sur les sites d'inflammation (où la concentration de CXCL8 est élevée), tandis que CXCR2 participe à la phase initiale de la migration cellulaire (où CXCL8 est au niveau picomolaire) [208]. De plus, la différence fonctionnelle entre CXCR1 et CXCR2 peut être régulée par la durée du signal intracellulaire [209].

Néanmoins, la mise en évidence du rôle respectif de ces deux récepteurs en réponse à la stimulation par CXCL8 n'est pas toujours évidente. Le *knockdown* de CXCR1 et/ou CXCR2 dans les cellules endothéliales a montré que les deux récepteurs jouent un rôle essentiel dans la prolifération, la survie, la migration, l'invasion et l'angiogenèse de ces cellules sous l'effet de CXCL8 [210][211]. Ces données sont confirmées par d'autres études utilisant des anticorps contre CXCR1/2 et des études *in vivo* avec des souris CXCR2^{-/-} [212][213]. Ainsi, l'inactivation de l'un ou l'autre des récepteurs pourrait être suffisante pour altérer l'angiogenèse médiée par CXCL8. En effet, la double extinction de CXCR1 et CXCR2 dans les cellules endothéliales n'a pas aggravé l'effet observé de l'inactivation seule de CXCR1 ou CXCR2 [214].

3.4. Rôle de l'IL-8 dans les maladies cardiovasculaires

a. Études précliniques

D'après plusieurs études, l'IL-8 joue un rôle important dans l'athérosclérose. L'IL-8 a été identifié dans les sites de lésions vasculaires, ce qui reflète son implication dans cette pathologie. *Rous et al.* ont démontré que l'IL-8 présente des taux élevés chez l'homme dans les zones athérosclérotiques artérielles, qui est présent soit au niveau cellulaire ou extracellulaire dans la matrice du tissu conjonctif [215]. *Apostolopoulos et al.* ont indiqué que les macrophages représenteraient la source principale d'IL-8 dans les plaques athérosclérotiques [216]. *Liu et al.* ont trouvé que l'IL-8 présente des taux élevés dans les cellules spumeuses des plaques athérosclérotiques en comparaison avec les monocytes et les macrophages dérivés de monocytes *in vitro* [217]. Dans cette étude il a été également montré que les oxystérols peuvent induire la synthèse d'IL-8 par les monocytes et les macrophages dérivés de monocytes. Cette production d'IL-8 a été proportionnelle à la dose et à la durée de traitement.

Suite à sa libération dans les plaques athérosclérotiques, plusieurs études ont été réalisées dans le but d'identifier des fonctions différentielles de l'IL-8 dans la progression de la plaque athérosclérotique. Dans ce but, l'étude de *Gerszten et al.* a démontré que, parmi toutes les chimiokines, seule l'IL-8 peut faire rouler les monocytes pour adhérer aux monocouches endothéliales qui expriment la sélectine E. Ainsi, l'IL-8, considérée avant comme un simple chimio attracteur des neutrophiles, peut aussi contrôler l'interaction entre les monocytes et les cellules endothéliales [218]. De plus, *Moreau et al.* ont détecté une expression importante de l'inhibiteur tissulaire de la métallopeptidase (TIMP)-1 dans plusieurs zones contenant des macrophages et ont démontré également que l'IL-8 inhibe le TIMP-1[219]. D'après ces résultats, ils ont conclu que l'IL-8 peut avoir un rôle athérogène car elle entraîne un déséquilibre entre les MMPs et leurs inhibiteurs dans la MEC des plaques athérosclérotiques. Par ailleurs, l'IL-8 peut contribuer au processus athérosclérotique en agissant directement sur les CML. Dans une étude réalisée par *Yue et al.*, il a été démontré que l'IL-8 peut stimuler la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire d'une manière concentration-dépendante dans les CML aortiques humaines et de rat [220].

D'après d'autres études, l'IL-8 peut également jouer un rôle important dans des autres pathologies cardiovasculaires. L'étude réalisée par *Kim et al.* montre qu'elle est impliquée dans la pathogenèse de l'hypertension [20]. Dans cette étude ils ont montré que l'expression de l'IL-8 dans les CML isolées à partir de l'aorte thoracique de rats hypertendus (SHR) est significativement plus importante que celle observée dans les CML isolées à partir des rats normotendus (WKY) (**Figure 21**). Le rôle angiogénique de l'IL-8 a également été étudié par *Simonini et al.* [221], montrant que la neutralisation de l'IL-8 réduit la néovascularisation cornéenne *in vivo*, dans un modèle de micropoches de cornée de rat. De plus, *Boyle et al.* ont montré un effet réducteur de l'inhibition directe de l'IL-8 sur le degré de nécrose dans un modèle d'ischémie myocardique du lapin [222].

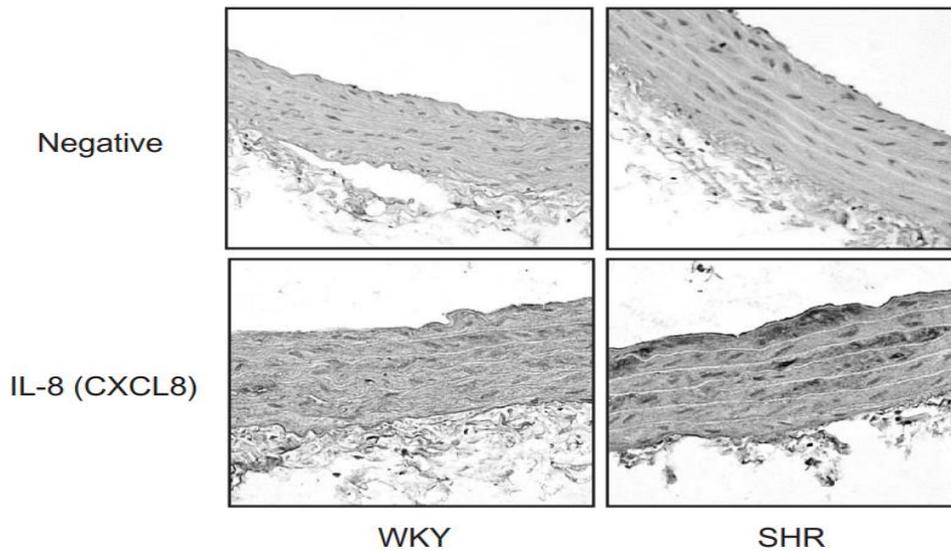


Figure 21 : L'expression d'IL-8 dans la région de l'endothélium et de l'intima du muscle lisse vasculaire de l'aorte thoracique des rats hypertendus (SHR) et normotendus(WKY) (Hyo Young KIM et al., 2008)[20]

b. Études cliniques :

Plusieurs études cliniques ont été réalisées dans le but de déterminer si l'IL-8 pourrait être un marqueur de certaines pathologies cardiovasculaires ou une cible thérapeutique potentielle. Dans une étude réalisée par *Inoue et al.* chez des patients coronariens, l'IL-8 était la seule cytokine testée liée aux événements cardiovasculaires indépendamment de neuf autres cytokines et de la CRP [223]. Une autre étude a montré que les concentrations sériques d'IL-8 étaient significativement plus élevées chez les sujets coronariens que chez les sujets témoins [224]. Par ailleurs, la comparaison des concentrations sériques d'IL-8 chez les patients atteints de coronaropathie stable et instable montre que des niveaux élevés d'IL-8 ont été observés chez des patients atteints de coronaropathie instable. Ainsi, l'IL-8 pourrait être un marqueur prédictif clinique de la coronaropathie instable, c'est-à-dire en cours de progression [225]. Des résultats similaires ont été rapportés par *Hashmi et Zeng* montrant que les patients ayant des signes cliniques de coronaropathie (angor instable) ont des concentrations sériques élevées d'IL-8 en comparaison avec les patients présentant une coronaropathie stable [226]. En outre, *Kim et al.* ont indiqué que les valeurs sériques élevées de MCP-1 et d'IL-8 sont corrélées à des paramètres liés à l'obésité comme l'indice de masse corporelle, la CRP, l'IL-6 et la lipoprotéine de haute densité. D'après ces résultats, ils ont

suggéré que le MCP-1 et/ou L'IL-8 pourrait être un marqueur prédictif des problèmes métaboliques liées à l'obésité tels que le diabète et l'athérosclérose [227]. Conformément à ces résultats, *Trøseid et al.* ont rapporté que l'exercice physique peut réduire significativement les niveaux sériques de MCP-1 et d'IL-8, en comparant les patients atteints du syndrome métabolique et qui suivent un programme d'exercice physique avec les sujets témoins sans exercice. Ainsi, l'effet protecteur de l'exercice pourrait être dû à l'atténuation de la réaction inflammatoire [224].

Chez des patients atteints de la fibrillation ventriculaire, il a été démontré que les concentrations sériques de TIMP-1 et d'IL-8 élevées sont associées à un risque d'infarctus du myocarde [229]. Une étude a été réalisée par *Panichi et al.* pour tester l'association de l'IL-8 sérique avec le pronostic des patients atteints d'insuffisance rénale terminale [230]. Ils ont démontré que l'IL-8 est un marqueur prédictif indépendant de la mortalité liée aux complications cardiovasculaires chez ces patients.

Malgré le peu de données disponibles, certaines études récentes suggèrent un rôle potentiel de l'IL-8 dans le RAC. Une analyse bio-informatique exploitant les profils d'expression des gènes de 15 valves aortiques humaines calcifiées comparées à 14 valves aortiques saines montre que le gène d'IL-8 figurerait parmi les gènes prédictifs du RAC (**Figure 22**) [21]. Une étude d'une cohorte récente a été menée par *Mahesh K. Vidulasur et al.* chez 708 patients atteints de sténose valvulaire aortique afin d'identifier les facteurs associés à cette pathologie [231]. La corrélation entre 49 biomarqueurs et le risque de décès et/ou d'hospitalisation causée par une insuffisance cardiaque a été analysée. Les résultats ont montré que l'IL-8 était parmi les marqueurs significativement liés au décès ou à l'hospitalisation ($P=0.0009$). Alors qu'il avait été conclu dans une étude précédente que les facteurs inflammatoires ne pourraient sans doute pas être considérés comme des marqueurs de pronostic chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque, cette étude montre, à l'inverse, une forte corrélation entre l'IL-8 et la sévérité de l'insuffisance cardiaque dans le contexte particulier de la sténose valvulaire aortique, corroborant l'hypothèse inflammatoire de la physiopathologie du RAC et de sa progression.

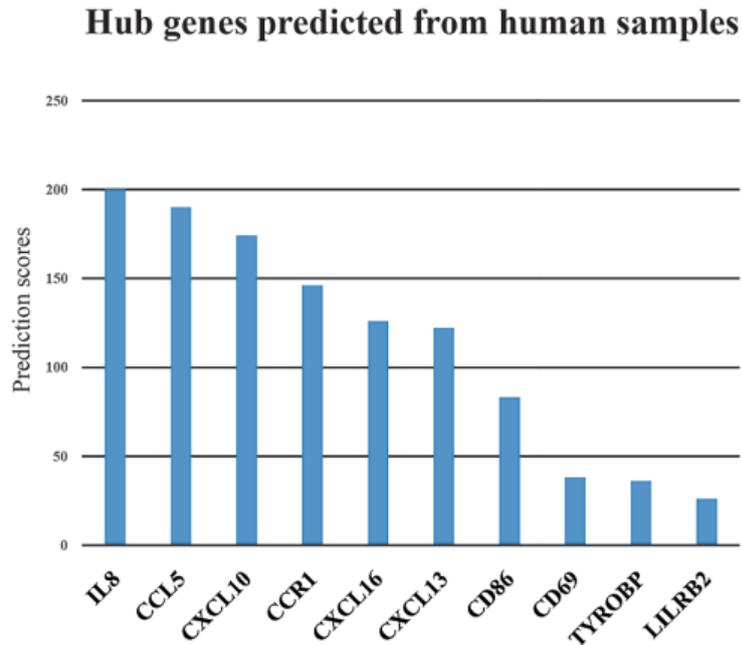


Figure 22 : Les 10 gènes ayant les scores de prédiction les plus élevés (Mu Liu et al., 2017)[21]

3.5. Rôle de CXCR1 et CXCR2 dans les maladies cardiovasculaires

Les récepteurs CXCR1 et CXCR2 joueraient un rôle majeur dans les maladies cardiovasculaires en particulier l'athérosclérose, les maladies ischémiques, l'hypertension et le remodelage cardiaque.

a- Athérosclérose

CXCR2 joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose en assurant le chimiotactisme des cellules inflammatoires. En effet, l'hypercholestérolémie induit une infiltration de neutrophiles dépendante du CXCR2 observée dans les lésions aortiques précoces [232]. Il a également été démontré que CXCR2 a un impact majeur sur l'accumulation de macrophages dans les lésions athérosclérotiques avancées. Chez les souris *knock-out* pour le récepteur de LDL développant de l'athérosclérose (souris LDLR^{-/-}), une déficience supplémentaire en CXCR2 dans la moelle osseuse a considérablement réduit la gravité des lésions athérosclérotiques [233]. Les souris LDLR^{-/-}, irradiées et recevant des cellules de moelle osseuse dépourvues de CXCR2, ont montré des lésions athéromateuses moins avancées, avec un noyau lipidique plus petit, moins de prolifération de CML et moins de macrophages que celles recevant des cellules de moelle osseuse exprimant CXCR2 [234].

La réduction de l'infiltration des macrophages était plus remarquable dans les lésions athérosclérotiques avancées qu'aux stades précoces [235], suggérant un rôle important des monocytes exprimant CXCR2 dans la progression de la maladie plutôt que dans son initiation [236]. L'implication de CXCR2 dans le recrutement de cellules inflammatoires au cours de l'athérosclérose peut être favorisée par des ligands non canoniques surexprimés dans la paroi artérielle. Par exemple, le facteur inhibiteur de migration (MIF) agit comme agoniste du récepteur CXCR2 et exerce une activité chimiotactique en recrutant des monocytes dans les plaques d'athérosclérose [237]. Conjointement au rôle de CXCR2 dans le recrutement des monocytes au niveau artériel, les effets athérogènes de CXCR2 peuvent également être attribués à des effets sur l'activité de ces cellules dans un contexte de régime riche en graisses [238]. De plus, il a été démontré que l'activation des mastocytes périvasculaires, qui participent à la progression et à la déstabilisation de la plaque, augmente l'adhérence des monocytes à la zone proximale des plaques d'athérome et ce de manière dépendante de CXCR2 et VCAM-1 [239]. La stimulation de CXCR2 favorise également l'activité athérogène d'un dérivé de la dioxine [240]. Cet effet passe par l'induction d'une réponse inflammatoire au niveau vasculaire en activant la voie de signalisation dépendante du récepteur des aryl-hydrocarbures (AhR). Toutefois, la cicatrisation vasculaire pourrait également dépendre de l'activation de CXCR2 [241]. Cette cicatrisation pourrait être bénéfique ou pathologique selon les cas. En effet, CXCR2 contribuerait à la réendothélialisation et la régénération endothéliale après une lésion vasculaire, mais également à favoriser la néo angiogenèse intraplaque dans l'athérosclérose [212].

b- Maladies ischémiques

L'ischémie conduit à la production de ROS, ainsi qu'à la sécrétion à des niveaux élevés de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, déclenchant le recrutement de leucocytes circulants, incluant les neutrophiles, dans les tissus. Les récepteurs CXCR1/2 jouent un rôle critique dans l'inflammation associée aux maladies ischémiques. Plusieurs études ont confirmé le rôle des récepteurs CXCR1/2 dans différents modèles d'ischémie intestinale [242], hépatique [243][244][245], pulmonaire [246][247], rénale [248][249], myocardique [250] et cérébrale [251][252][253]. Par exemple, suite à une lésion d'ischémie-reperfusion myocardique *in vivo*, Tarzami et al. ont rapporté que les souris CXCR2-/- présentaient des infarctus environ 50 % plus petits que ceux des souris de type sauvage, avec

environ 44 % moins de cellules inflammatoires [254]. Chez l'homme, il a été démontré que le risque d'AVC ischémique chez les personnes souffrant d'hypertension serait associé au polymorphisme génétique rs1126579, correspondant à la substitution de T en C en position 1235 au niveau le 3'-UTR du gène CXCR2, entraînant une surexpression du récepteur [255].

c- Hypertension et remodelage cardiaque

Il a été démontré que CXCR2 contribue à la pathogenèse de l'hypertension artérielle et du dysfonctionnement vasculaire, ainsi qu'au remodelage cardiaque associé à l'hypertension. En effet, l'expression de CXCR2 augmente dans les cœurs de souris recevant de l'angiotensine II (Ang II) en perfusion continue [256], et chez les rats spontanément hypertendus (SHR) [257]. L'hypertension artérielle était associée à une infiltration de monocytes dans les artères et cet effet était médiée par CXCR2. L'inhibition de l'activité de CXCR2 par délétion génétique ayant atténué le développement de l'hypertension chez la souris [258][256]. La délétion du gène CXCR2 a réduit l'effet de l'Ang II sur l'infiltration des monocytes dans le cœur, améliorant ainsi le remodelage cardiaque et son dysfonctionnement chez les souris. De plus, une diminution de l'expression du factor Krüppel-like 15 (KLF15), un facteur de transcription abondamment exprimé dans les cardiomyocytes et jouant un rôle dans la régulation de l'expression des gènes inflammatoires, s'est avérée associée à une augmentation de l'expression de CXCL1 et CXCR2 dans les cœurs de souris perfusées avec l'Ang II [259]. La déficience en KLF15 dans les fibroblastes cardiaques a augmenté l'expression de CXCL1 (ligand murin de CXCR1/2), ce qui est associée à une infiltration cardiaque majorée de cellules CXCR2-positives, et a ainsi aggravé le remodelage et le dysfonctionnement cardiaque en réponse à l'Ang II. Chez l'homme, la proportion de cellules pro-inflammatoires CXCR2+ circulantes s'est avérée plus élevée chez les patients hypertendus que chez les témoins [258]. De plus, le nombre de monocytes CXCR2+ s'est avéré plus élevé en cas défibrillation auriculaire [260]. L'hypertension artérielle induit la mobilisation et l'infiltration dans les oreillettes cardiaques de monocytes CXCR2+ dérivés de la moelle osseuse, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et de dérivés superoxydes, provoquant une fibrose auriculaire et des anomalies électriques, et entraînant ainsi une susceptibilité accrue à la fibrillation auriculaire. À l'inverse, l'ablation génétique de CXCR-2 ou son inhibition pharmacologique (agent

SB225002) chez les souris perfusées avec de l'Ang II a considérablement abrogé ces effets (**Figure 23**) [22].

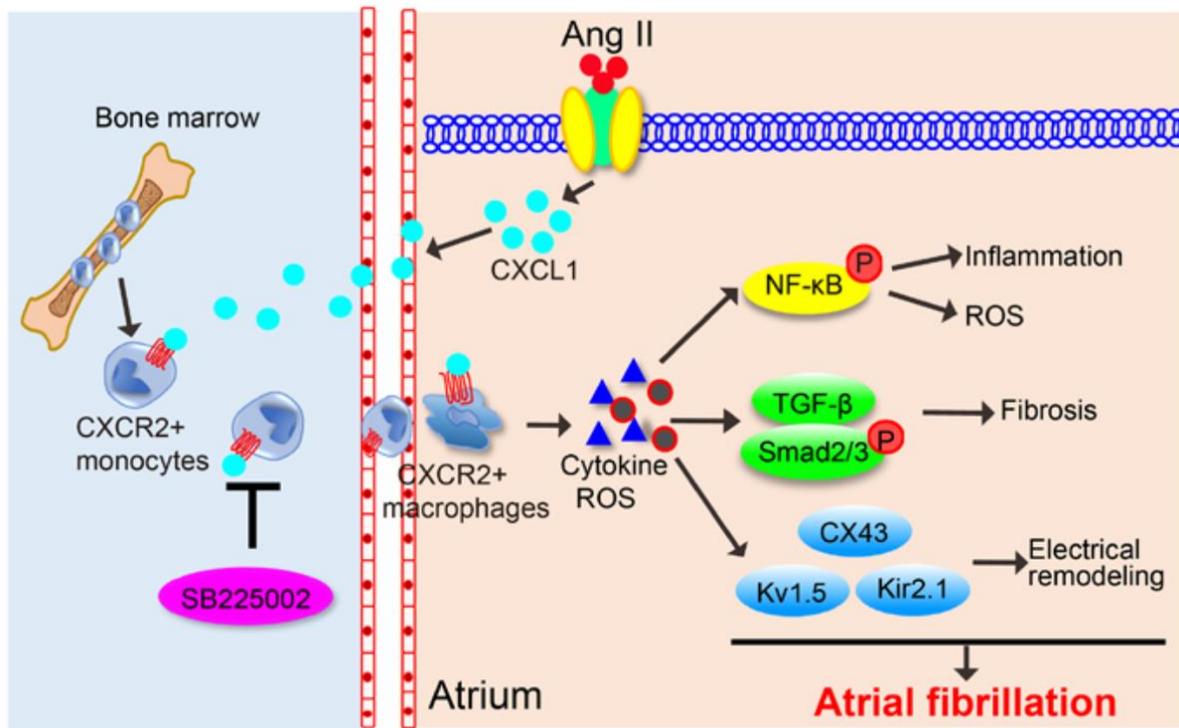


Figure 23 : Prévention de la fibrillation atriale par l'inhibition pharmacologique de CXCR-2 (Zhang et al., 2020)[22]

HYPOTHÈSE
ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Comme nous l'avons vu, la calcification de la valve aortique est le résultat d'un mécanisme physiopathologique complexe conduisant au RAC. L'inflammation joue un rôle clé dans la progression de la maladie. Or, à ce jour, il n'existe pas de traitement pharmacologique de cette pathologie. L'étude du rôle des cytokines inflammatoires dans la progression du RAC permettrait de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Un travail précédent réalisé dans le laboratoire MP3CV a montré le rôle d'IL-8 dans la calcification vasculaire. Par ailleurs, de nombreux arguments précliniques et cliniques indiquent que l'IL-8 et ses récepteurs jouent un rôle important dans les maladies cardiovasculaires à composante inflammatoire. Pourtant, à ce jour, aucune étude n'a étudié spécifiquement ce rôle dans la calcification valvulaire aortique.

Au cours de ce travail, nous avons fait l'hypothèse que l'IL-8 stimule la calcification valvulaire aortique et que cet effet peut être prévenu en bloquant pharmacologiquement CXCR1/2.

- A-** Dans un premier temps, nous avons étudié *in vitro* le rôle de l'IL-8 dans la calcification des cellules interstitielles de la valve (hVICs). Nous avons vérifié l'expression des récepteurs d'IL-8 par les hVICs, exploré la voie de signalisation activée, testé l'effet de l'IL-8 sur la calcification des hVICs et étudié le mécanisme mis en jeu dans ce processus.
- B-** Afin de donner une relevance clinique aux résultats précédents obtenus sur le modèle cellulaire, nous avons travaillé sur des valves humaines de patients atteints de RAC et ayant subi un remplacement valvulaire aortique chirurgical. Nous avons comparé l'expression des récepteurs CXCR1/2 ainsi que d'autres marqueurs qui nous semblent impliqués dans le processus de calcification. Ce travail a eu pour objectif de renforcer, du côté clinique, nos résultats obtenus *in vitro* sur les hVICs en culture.
- C-** Afin de reproduire notre modèle cellulaire sur un modèle tissulaire plus complexe et vu l'indisponibilité des valves humaines saines en quantité suffisante, nous avons choisi de travailler sur des valves aortiques récupérées de porcs sains. Nous avons ainsi testé l'effet de l'IL-8 sur la calcification de ces valves cultivées en culture.
- D-** Enfin afin de passer vers un modèle animal, nous avons testé l'intérêt du blocage pharmacologique de CXCR1/2 dans un modèle de calcification des valves implantées en sous cutané (SC) chez les rats. Bien que ce modèle de calcification ne mime pas forcément la calcification chez les patients atteints du RAC mais plutôt celle des bioprothèses implantées pour traiter le RAC. L'étude de ce modèle nous permet de

comprendre les mécanismes impliqués dans la calcification des bioprothèses (potentiellement similaires ou différentes du RAC) et d'identifier des cibles thérapeutiques pour prévenir leur calcification.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Modèle cellulaire : hVICs en culture

1.1. Culture des hVICs

Des valves aortiques humaines ont été prélevées chez des patients atteints de sténose valvulaire aortique subissant une chirurgie de remplacement valvulaire au bloc chirurgical du CHU Amiens Picardie (Amiens, France) (**Figure 24**). Conformément à la législation française, les patients ont donné leur consentement éclairé à la participation par donation des valves qui restent anonymisées. Sous hôte stérile, les zones non calcifiées ont été séparées des zones calcifiées des valves à l'aide d'un scalpel dans une boîte B100 remplie de sérum physiologique. Afin d'isoler les cellules interstitielles valvulaires (hVICs), les cellules endothéliales valvulaires (hVECs) ont été retirées des zones non calcifiées en incubant les petits morceaux contenant ces zones pendant 10 min à 37 °C dans une solution de collagénase de type A (ref. 10103586001, Roche) préparée à 1,5 mg/ml dans du HBSS (ref. H6648, Sigma Aldrich). Après élimination des hVECs, ces zones non calcifiées ont été rincées avec du sérum physiologique puis découpées en des petits morceaux de 2 à 3 mm à l'aide d'un scalpel. Ces petits morceaux de valves ont été par la suite incubés toute la nuit à 37°C dans une solution contenant de la collagénase type A préparée à 1,5 mg/ml dans du milieu de base DMEM (ref. D6546, Sigma Aldrich) contenant 1 % de pénicilline et streptomycine (ref. P4333, Sigma Aldrich) et 1% glutamax (ref. 35050-038, Gibco) sous agitation lente afin de digérer le tissu et isoler les hVICs.

Le lendemain, la suspension cellulaire a été passée dans un tamis cellulaire de 70 µm puis centrifugée pendant 5 min à 16,1 g à température ambiante. Le surnageant a été jeté et le culot a été suspendu avec le DMEM complété par 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de pénicilline/streptomycine et 1% glutamax dans une flasque de 75 cm² permettant d'amplifier la culture jusqu'à 1 million de hVICs.

Les cellules ont été cultivées à 37°C et à 5% de CO₂ avec un changement de milieu tous les 2 jours et un passage des cellules a été effectué à 95 % de confluence. Toutes nos expériences ont été effectuées entre les passages 3 et 6 pour limiter le changement phénotypique des hVICs principalement observé après le passage 6 qui pourrait affecter la reproductibilité de nos résultats.

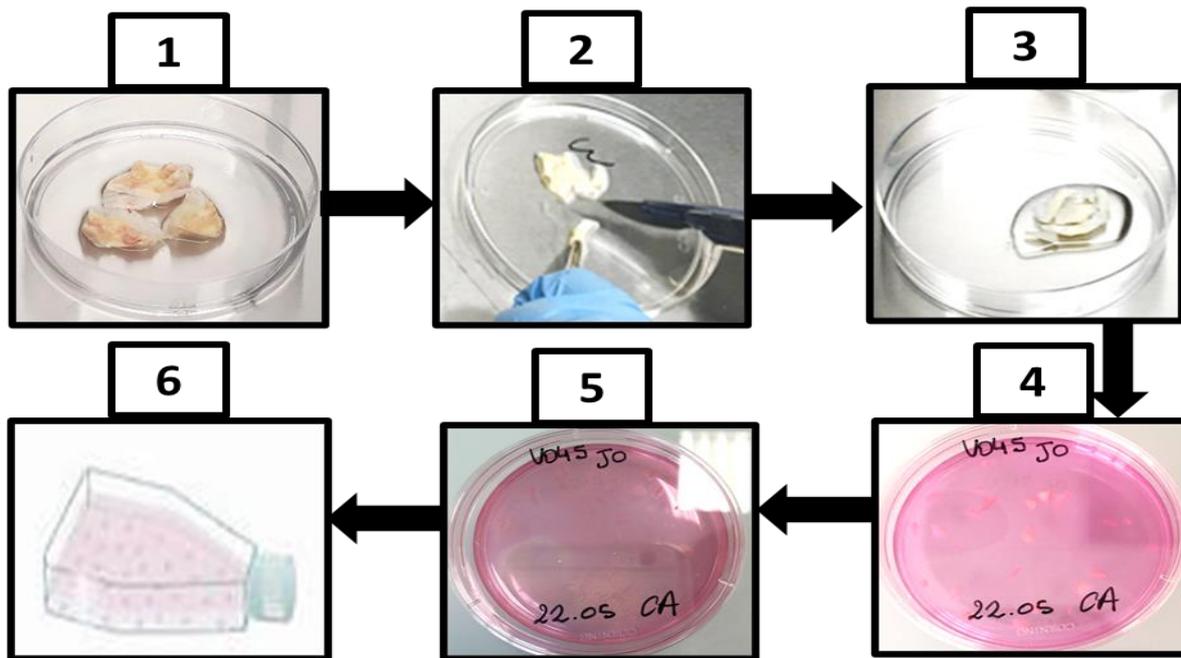


Figure 24 : Les différentes étapes de l'isolement des hVICs à partir des valves aortiques humaines récupérées des patients ayant subi un remplacement valvulaire chirurgical

1.2. Induction de la calcification

La calcification a été induite en cultivant les hVICs dans un milieu de minéralisation caractérisé par la présence d'une concentration en phosphate de 3,8 mM ajouté au milieu de culture de base (DMEM 1% SVF + 1 % penicilline/streptomycine + 1 % glutamax) (le milieu contient initialement 1 mM de Phosphate). Cette calcification des hVICs a été produite dans des plaques de 48 puits (avec 12 000 cellules par puit) et a pu être évaluée après 14 jours de culture.

Différents traitements supplémentaires ont été testés. La calcification des hVICs a été testée en présence de 5, 15 ou 50 pg/ml d'IL-8 humaine (ref. I645, Sigma-Aldrich), 0, 5, 1 ou 2 μ M d'antagoniste de CXCR1/2 : (SCH527123, ref. 331-10731-1, Tebu-bio), 5, 15 ou 50 μ M d'inhibiteur MMP-12 (MMP408, ref. 444291, Sigma-Aldrich), ou 5, 15 ou 50 μ M d'inhibiteur NF κ B (JSH-23, ref. J4455, Sigma-Aldrich), ajoutés au milieu de minéralisation.

Parallèlement, l'effet du sérum de patients atteints de sténose valvulaire aortique sévère sur la calcification des hVICs a été étudié. Les cellules ont été exposées à un pool de sérums de patients atteints de sténose valvulaire aortique sévère ou de sérums de patients

sains (qui n'ont pas de sténose valvulaire) rajouté au milieu de minéralisation (3,8 mM Pi), en présence ou non d'antagoniste de CXCR1/2 (2 μ M SCH527123).

D'autre part, pour étudier l'effet de la présence d'élastine sur la calcification des hVICs, les cellules ont été cultivées dans des plaques à 48 puits préalablement recouvertes ou non par 2 μ g/ml d'élastine humaine purifiée (ref. E6902, Sigma-Aldrich), puis traitées avec le milieu de minéralisation avec ou sans 15 pg/ml d'IL-8.

1.3. Test de viabilité cellulaire

L'effet de l'IL-8 sur la viabilité des hVICs a été analysé par MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium, ref. M5655, Sigma-Aldrich). Les hVICs (7000 cellules par puits dans une plaque 96 puits) ont été cultivées pendant 1, 3, 5, 7, 14 et 21 jours avec ou sans 3,8 mM de phosphate et avec ou sans 5, 15 ou 50 pg/ml IL-8. Après traitement, la solution de MTT a été ajoutée sur chaque puits (la concentration finale de MTT est de 500 μ g/ml) et la plaque a été incubée pendant une heure à température ambiante. Les cristaux de formazan formés par les cellules vivantes ont été dissous avec du DMSO et l'absorbance a été mesurée à 570 nm.

1.4. Coloration au rouge alizarine

Pour analyser la calcification des hVICs induite par nos différentes conditions de traitement, nous avons utilisé la méthode de coloration par rouge alizarine. Cette méthode permet de mettre en évidence les dépôts calciques des cellules dus à la fixation du rouge alizarine au calcium par un processus de chélation. Ceci permet par la suite la formation de complexes rouge alizarine-Calcium, qui peuvent être détectés au microscope optique.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 48 puits puis traitées avec nos différentes conditions de traitement comme décrit auparavant. Chaque condition de traitement a été réalisée en triplicats. De plus, des puits sans cellules recevant les mêmes conditions de traitement ont permis d'analyser le dépôt passif du calcium. À J14, le milieu de traitement a été retiré de chaque puits et les cellules ont été rincées avec de l'éthanol 50% puis fixées avec de l'éthanol 50% pendant 5 min et ensuite avec de l'éthanol 75% pendant 5 min également. Un volume de 250 μ l d'alizarine (ref. A5533-25G, Sigma Aldrich) à 40 nM et

pH 4,2 a été rajouté sur chaque puits, puis laissé pendant 5 min afin de laisser le temps à l'alizarine de se fixer au calcium et former les complexes rouge alizarine-calcium. Les puits ont ensuite été rincés 2 fois à l'éthanol 50% pour se débarrasser de surplus d'alizarine. Des photos représentatives des puits ont été prises avant de faire dissoudre l'alizarine par ajout de 200µl de chlorhydrate de cétypyridinium (ref. c9002, Sigma Aldrich) sur chaque puits. Ensuite la plaque a été soumise à une agitation douce de 15 min à température ambiante. De chaque puits, 150 µl de surnagent a été transféré dans une nouvelle plaque à 96 puits. Enfin, le dépôt du calcium a été mesuré à 562 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Envision®).

1.5. Dosage du calcium

Une autre méthode pour l'analyse de la calcification est le dosage du calcium grâce à la formation d'un complexe avec l'ortho crésolphtaléine qui génère un complexe de couleur violette. La concentration de l'échantillon en calcium est proportionnelle à l'intensité de la couleur violette formée, ce qui permet une mesure quantitative plus précise de la calcification. Pour se faire, après 14 jours de traitement des cellules préalablement ensemencées dans des plaques 48 puits comme décrit précédemment, le milieu de traitement a été retiré, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et un volume de 300µl de HCl 0,6 N a été ajouté sur chaque puits. La plaque a été laissée sous agitation douce à 4°C toute la nuit afin de bien décalcifier les cellules.

Le lendemain un mélange contenant 191 µg/ml d'o-crésolphtaléine et 2,33 mg/ml de 8-hydroxyquinoline avec du 2-Amino-2-methyl-1-propanol 0,5 M a été préparé. Le mélange a été chauffé pendant 2 heures à 65°C après l'avoir couvert de parafilm pour éviter son évaporation. Un volume de 25 µl d'échantillon a été prélevé dans chaque puits de la plaque à 48 puits puis déposé dans une nouvelle plaque à 96 puits. Un volume de 150 µl du mélange réactionnel a été ajouté sur chaque puits. La plaque a été ensuite agitée pendant 15 min à température ambiante. Enfin l'absorbance a été lue à 565 nm à l'aide du lecteur des microplaques (Envision®).

1.6. Extraction d'ARNm

Les hVICs ont étéensemencées dans des plaques 6 puits (200 000 cellules/puits) puis traitées pendant 2 jours avec différentes conditions de traitement. À J3, les cellules ont été lavées au PBS 1X (ref. D8537, Sigma Aldrich), décollées avec de la trypsine EDTA (ref. T4049, Sigma Aldrich) puis centrifugées (5min, 16,1 g, 21°C). Ensuite, le surnageant a été jeté puis l'ARN a été extrait à partir du culot en utilisant le kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Sous l'hôte, un volume de 350 µl du tampon de lyse RLT avec un petit volume de 2,5 µl de β-mercaptoéthanol ont été ajoutés aux échantillons à l'aide d'une pipette puis homogénéisés pour bien lyser les cellules. Ensuite, un volume de 350 µl d'éthanol à 70 % a été ajouté dans chaque condition et l'ensemble a été bien mélangé puis transféré dans chaque colonne. Le tube a été fermé et centrifugé pendant une minute à 8000 g puis le liquide du tube collecteur a été jeté. Un volume de 700 µl RW1 a été ensuite additionné sur chaque colonne qui a été de nouveau centrifugé pendant une minute à 8000 g puis le liquide a été jeté. Ensuite, un volume de 500 µl de RPE a été ajouté sur la colonne et le tube a été également centrifugé pendant une minute à 8000 g. Cette étape a été ensuite répétée de la même manière mais la centrifugation a été effectuée pendant 2 min. Enfin, le tube collecteur a été remplacé par un autre nouveau tube et un volume de 20 µl d'eau « RNase free » a été ajouté pour éluer les ARN dans le tube collecteur par centrifugation pendant 1 minute à 8000 g. Enfin, le tube contenant l'ARN a été rapidement placé à 4°C pour éviter la dégradation de celui-ci. L'ARN a été ensuite dosé à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoVue™ Plus, Thermo Fisher Scientific) puis conservé à -80°C jusqu'à utilisation ultérieure.

1.7. Transcription inverse

Les ARNm ont été retranscrits en ADNc par transcription inverse grâce au Kit « High Capacity RNA-to-cDNA » (Thermo Fisher Scientific) selon les instructions du fournisseur. Brièvement, un volume équivalent à 1 µl a été complété jusqu'à 20 µl avec le tampon contenant des randoms primers, des désoxyribonucléotidestriphosphate (dNTP), et la transcriptase inverse. La plaque a été ensuite couverte puis placée dans le thermocycleur iCycler (Bio-Rad). Les échantillons d'ADNc obtenus ont été placés à -20°C jusqu'à utilisation.

1.8. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

L'expression des différents gènes d'intérêt a été analysée par « quantitative polymérase chain reaction » (qPCR). La qPCR a été réalisée dans des plaques 96 puits via le kit Power SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific). Un mélange réactionnel a été préparé et comprend pour chaque puits : 2,75 µL d'eau nuclease-free, 6,75 µL de SYBR Green et 0,25 µL de chacune des amorces spécifiques du gène analysé (reverse et forward listés dans le (**Tableau 5**) préparé à 10 µM. Un volume de 2,5 µL d'ADNc préalablement dilué à 1/10 a été mélangé avec 7,5µl du mélange réactionnel dans chaque puits. La plaque a été ensuite couverte puis centrifugée pendant 20 secondes. La quantification en temps réel a été réalisée avec le thermocycleur Bio-Rad CFX connect™(Biorad Laboratories) alors que le programme Bio-Rad CFX Manager 3.1 a servi pour l'analyse. La normalisation a été réalisée par rapport au gène de référence GAPDH pour lequel le niveau d'expression d'ARN est constant dans les différentes conditions expérimentales.

Tableau 5 : Liste des séquences d'amorces utilisées pour la Quantitative polymérase chain reaction (qPCR)

Gene	Forward primer 5'----3'	Reverse primer 5'----3'
OPN	5'-ATC ACCTGTGCCATACCAGTTAAAC-3'	5'-CCACAGCATCTGGGTAT TTG-3'
BMP2	5'-CGGACTGCGGTCTCCTAA-3'	5'-GGAAGCAGC AACGCTAGAAG-3'
OSX	5'-GCCTTGCCATACACCTTGC-3'	5'-CTCCTGCGACTGCCCTAAT-3'
ALP	5'-CCTGGAGCTTCAGAAGCTCAA -3'	5'-ACTGTGGAGACACCCATCCC-3'
Collagen1	5'-ACGAAGACATCCCACCAATCAC- 3'	5'- TCATCGCACAACACCTTGC-3'
Collagen3	5'-GAAGGGCAGGGAACAACCTTG-3'	5'- TTTGGCATGGTTCTGGCTTC-3'
Elastin	5'-GGCCATTCTGGTGGAGTTCC-3'	5'-AACTGGCTTAAGAAGTTGCCTCCA-3'
α-SMA	5'-CCAGCAGATGTGGATC AGCA-3'	5'-AAGCATTTGCGGTGGACAAT-3'
MMP2	5'-TGAGAAGGATGGCAAGTACG-3'	5'-GGAAGCGGAATGGAACTTG-3'
MMP9	5'-AGAACCAATCTCACCGACAG-3'	5'-ATTTGACTCTCCACGCATC-3'
MMP12	5'-TCCCCGATGTCCATCATTTTC-3'	5'-ATCCTCACGGTTCATGTCAG-3'
GAPDH	5'-TCGGAGTCAACGGATTTGG-3'	5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA-3'

1.9. Extraction et quantification de protéines

Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X deux fois à froid, puis grattées à l'aide d'un grattoir dans un tampon de lyse NP-40 (25 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA et 1 % SDS, pH 7,4) préparés avec d'inhibiteurs de phosphatases (Roche) et de protéases et un inhibiteur de tyrosine phosphatase (Vanadate). Le mélange des cellules homogénéisé avec le tampon de lyse de chaque condition a été repris dans un eppendorf placé dans la glace. Les échantillons ont été ensuite agités pendant 20 min à 4°C puis centrifugés à 16060 g pendant 30 min. Enfin, les surnageants contenant nos protéines ont été récupérés et les protéines ont été dosées à l'aide du kit de dosage des protéines DC™ (Bio-Rad).

1.10. Western blot

L'expression des différentes protéines d'intérêts a été analysée par Western blot. Les protéines ont été diluées dans le tampon de lyse de manière à obtenir une quantité de protéines à déposer égale entre les conditions puis mélangées avec un tampon de Laemmli. Ces échantillons ont été ensuite chauffés pendant 5 min à 99°C puis séparés par un gel de polyacrylamide à 10% en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) pendant 2 h à 100 volt dans un tampon de migration composé de 25 mM Tris/HCl (pH 8.6 - 8.8), 192 mM de Glycine et 0.1 % de SDS. Ensuite, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Hybond™ ECL™). Le transfert a été réalisé à froid pendant 2h à 60 volt dans un tampon composé de 25 mM Tris, 192 mM de Glycine, 20 % d'éthanol et 0.1 % de SDS. La réussite du transfert des protéines du gel vers la membrane ainsi que le profil des bandes ont été vérifiés par coloration au rouge Ponceau. Ensuite, les sites non spécifiques de la membrane ont été bloqués par incubation pendant une heure à température ambiante dans une solution de Tris Buffered Saline Tween (TBST) contenant 5% du lait. Enfin la membrane a été incubée toute la nuit sous agitation lente à 4°C avec nos solutions d'anticorps primaires (**Tableau 6**). Le lendemain, la membrane a été lavée 3 fois avec du TBST (10 min par lavage afin de retirer les anticorps non spécifiques faiblement fixés à la membrane), puis incubée pendant une heure à température ambiante avec la solution d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) sous agitation lente. Une série de 3 lavages a été ensuite effectuée puis la révélation des bandes d'intérêt a été réalisée par chimioluminescence à l'aide du système de détection ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham™) et de l'appareil

ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Ensuite les bandes ont été quantifiées de manière automatisée en utilisant le logiciel Image Lab (Bio-Rad). L'analyse de l'expression de l'actine ou de la GAPDH a été réalisée afin de normaliser l'expression des protéines d'intérêt entre les différentes conditions.

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés en Western blot

Anticorps	Référence	Fournisseur	Dilution	Diluant	Genre
α-Actine	SC-32251	Santa Cruz	1/1000	Lait	Monoclonal mouse IgG 2a
GAPDH	14C10	Cell Signalling	1/1000	BSA	Monoclonal rabbit
CXCR1	MAB330	R&D Systems	1/500	BSA	Monoclonal mouse IgG2A
CXCR2	MAB331	R&D Systems	1/500	BSA	Monoclonal mouse IgG2A
IKb	9242	Cell Signaling	1/ 1000	BSA	Polyclonal Rabbit
P65	SC-8008	Santa Cruz	1/500	Lait	Monoclonal Mouse IgG1 κ
P-P65	3033	Cell Signaling	1/500	BSA	Monoclonal Rabbit IgG
Elastine intact	SC-166543	Santa Cruz	1/200	BSA	Monoclonal mouse IgG2b
Elastine toutes forms	SC- 58756	Santa Cruz	1/200	BSA	Monoclonal mouse IgG1 κ
MMP12	SC-390863	Santa Cruz	1/500	Lait	Monoclonal mouse IgG1

1.11. Cytométrie de flux

Pour vérifier l'expression des récepteurs CXCR1 et 2 de l'IL-8 par les hVICs, des hVICs préalablement cultivées à raison de 200,000 cellules par puits dans une plaque 6 puits ont été lavées avec du PBS 1X, décollés à la trypsine, puis centrifugées pendant 5 min, à 16,1 g et à température ambiante. Ensuite le surnageant a été retiré et le culot cellulaire a été gardé. Un volume de 200 µl contenant un mélange d'anticorps anti-CXCR1 FITC (ref. 130-115-947, Miltenyi Biotec) avec anti CXCR2 APC (ref. 130-120-133, Miltenyi Biotec) dilués à 1/50^e dans du PBS 1X a été ajouté aux cellules qui ont alors été remises en suspension. L'ensemble a été bien homogénéisé et l'expression des récepteurs a été analysée immédiatement en utilisant le cytomètre Macsquant (Miltenyi Biotec). Des travaux préliminaires ont été réalisés. L'analyse de l'expression des récepteurs a été faite en décollant les cellules sans utiliser la trypsine (décollement avec PBS EDTA). En effet, la trypsinisation permet de décoller les cellules adhérentes avec un très bon rendement en quelques minutes mais présente l'inconvénient d'altérer l'expression de certains marqueurs membranaires sensibles à cette enzyme. Dans nos conditions, nous n'avons pas mis en évidence d'altération de l'expression de CXCR1/2 par l'utilisation de la trypsine. Par ailleurs, afin de vérifier les anticorps utilisés, des analyses ont été effectuées sur d'autres types cellulaires utilisés comme contrôles positifs car ils sont connus pour exprimer CXCR1 et CXCR2 : une lignée des fibroblastes (HT 1080) et les cellules sanguines CD15+ de volontaires sains. Les cellules sanguines CD15+ sont représentées en majorité par les polynucléaires neutrophiles. L'analyse a alors été réalisée sur cytomètre MACSQuant (Miltenyi Biotec, Paris, France).

1.12. Sécrétion de MMP-12

Le surnageant de culture des hVICs de chaque condition a été récupéré dans un eppendorf de 1,5 ml. Ces eppendorfs ont été centrifugés à 16,1 g pendant 15 min à 4°C puis les surnageants ont été transférés dans des nouveaux tubes qui ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation. La concentration de MMP-12 sécrétée par les hVICs a été mesurée dans le surnageant de culture après 48h de traitement. L'analyse de la MMP-12 sécrétée dans le milieu de culture a été faite par méthode ELISA selon les instructions du fournisseur du kit (ref. KTE61599, Tebu-bio).

1.13. Activité MMP-12

L'activité de la métalloprotéase MMP-12 a également été analysée après deux jours de traitement des hVICs avec nos différentes conditions de traitement. L'analyse de l'activité MMP-12 a été effectuée grâce au Kit SensoLyte® 520 MMP-12 (Ref. AS-71157, CliniSciences, Nanterre, France), par une méthode de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Une fois activée, la MMP-12 clive un peptide spécifique fourni dans le kit (mais dont la nature chimique n'est pas communiquée par le fabricant) permettant l'émission d'une fluorescence proportionnelle à l'activité MMP-12. Brièvement, un volume de 50 µl de chaque échantillon a été déposé dans une plaque noire à 96 puits. Parallèlement, une gamme de MMP-12 recombinante humaine (ref. AS-55525-1, CliniSciences) a été effectuée. Un volume de 5 µl du composant C (APMA, concentration finale 1mM) a été ajouté sur chaque puits et la plaque a été ensuite incubée pendant deux heures à 37°C. Cette étape permet l'activation de l'enzyme MMP-12 présent dans les différents échantillons. Après cette étape d'incubation, un volume de 50 µl de substrat de MMP-12 (composant C dilué à 1/100 dans le composant D) a été ajouté dans chaque puits. La plaque a été ensuite agitée doucement pendant 30 secondes puis incubée pendant une heure à 37°C afin de laisser le temps pour l'enzyme MMP-12 de digérer son substrat et émettre de la fluorescence. Enfin, un volume de 50 µl d'une solution stop (composant E) a été ajouté sur chaque puits. La plaque a été agitée doucement et l'intensité de la fluorescence a été mesurée à 505 nm ex./535 nm em. via un lecteur de microplaques TECAN.

2. Analyse des valves aortiques de patients atteints de RAC

Des analyses biochimiques et histologiques ont été réalisées sur des valves humaines des patients atteints de sténose valvulaire aortique. Comme pour l'isolement des cellules, des valves aortiques ont été récupérées du bloc chirurgical après remplacement valvulaire chez des patients atteints de sténose valvulaire aortique. Sous hôte stérile, la valve composée de trois feuillets valvulaires a été rincée avec du sérum physiologique puis coupée en deux parties à l'aide d'un scalpel : une première partie a servi pour l'analyse histologique et une deuxième partie pour l'analyse biochimique.

2.1. Analyse histologique des tissus

Les valves destinées aux analyses histologiques ont été fixées pendant une nuit au paraformaldéhyde (PFA 4%) puis deux autres nuits avec une solution de sucrose 20% la première nuit et 30% la seconde afin de déshydrater les tissus.

Ces valves ont été ensuite incluses dans des petites boîtes de congélation contenant du gel OCT (*Optimal cutting temperature compound*, ref. KMA-0100-00A, Cell Path). Ces boîtes contenant les valves ont été ensuite congelées dans de l'isopentane puis conservées à -80 °C. Quelques jours plus tard les valves ont été découpées au cryostat (LEICA CM 1950) en sections de 12 µm d'épaisseur en utilisant les lames SUPERFROST PLUS^R GOLD (Thermoscientific). Plusieurs lames d'une même valve ont été préparées afin qu'elles soient utilisées par la suite pour la coloration alizarine ainsi que pour les immunomarquages désirés. Ces lames ont été ensuite conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

a. Coloration alizarine sur tissu

Afin de distinguer les zones calcifiées et non calcifiées des valves des patients atteints de sténose valvulaire aortique, des colorations histologiques par rouge alizarine ont été effectuées. Le jour de la coloration les lames ont été ressorties du congélateur puis séchées pendant 30 min à température ambiante. La solution de rouge alizarine a été déposée doucement sur les coupes. L'excès de colorant a par la suite été enlevé et la déshydratation a été réalisée par incubation dans une solution d'acétone 100 % pendant 1 min puis dans une solution acétone-toluène (1:1) pendant 1 min également. Finalement, une incubation de 2 min dans une solution du toluène a été réalisée avant de faire le montage en utilisant la solution DPX (ref. 0652, Sigma Aldrich). Des photos des valves ont été prises à l'aide du microscope optique (LEICA DM 2500).

b. Immunomarquage des tissus

Afin de comparer l'expression de différentes protéines entre les zones calcifiées et non calcifiées des valves déjà identifiées par la coloration au rouge alizarine, des immunomarquages sur les tissus ont été effectués. Le jour d'immunomarquage, les lames ont été ressorties du congélateur puis séchées pendant 30 min à température ambiante. Ensuite,

les tissus ont été fixés pendant 5 min par une incubation dans une solution de PFA 4% dans du PBS suivis d'un rinçage avec le PBS pendant 5 min. Afin de démasquer les sites antigéniques et les rendre plus accessibles à la fixation des anticorps, une étape d'incubation dans une solution du citrate (ref. 100241, Merck) à 2,94 g/l a été réalisée dans l'incubateur à 100°C pendant 15 min. Une série de trois lavages avec le PBS Tween (préparé par ajout de 500 µl Tween dans 1 L de PBS) a été réalisée. Un lavage avec le PBS a été par la suite effectué afin de se débarrasser de tween restant sur les coupes. Ensuite, pour bloquer l'activité peroxydase endogène, les tissus ont été incubés pendant 10 min dans une solution de PBS contenant 1% de BSA et 0,3 % d'H₂O₂ (ref. 216763, Sigma Aldrich). Les lames ont été rincées deux fois avec du PBS puis le blocage des sites non spécifiques a été effectué par incubation pendant une heure dans une solution de PBS contenant 1% de BSA et 0,15 % de triton X-100.

Les tissus ont été incubés toute la nuit à 4°C avec des solutions d'anticorps primaires : anti-CXCR1 (ref. MAB330, R&D Systems, dilution 1:100), anti-CXCR2 (ref. MAB331, R&D Systems, dilution 1:50), anti-MMP-12 (ref. SC-390863, Santa Cruz, dilution 1:100) et anti-élastine (ref. SC-166543, Santa Cruz, dilution 1:25), diluées dans du PBS 1% BSA 0,1% Triton X-100. Le lendemain, les tissus ont été lavés trois fois avec du PBS puis incubés avec une solution d'anticorps secondaire IgG anti-mouse à activité peroxydase (ref. 7076, Cell signalling, dilution 1:750) dilué dans le PBS pendant une heure à température ambiante, puis les tissus ont été lavés trois fois au PBS. La révélation de l'activité peroxydase a été obtenue grâce à une incubation de 10 min dans la solution du Kit Vector^R Nova REDTM (VECTA MOUNTTM) préparée selon les recommandations du fournisseur. Les lames ont été ensuite rincées deux fois avec du PBS puis une fois avec de l'eau distillé (5 min/lavage). Une contre-coloration à l'hématoxyline a été réalisée pour marquer les noyaux des cellules. L'excès du colorant a par la suite été retiré et la déshydratation a été réalisée par deux incubations successives dans deux bains d'une solution d'éthanol 95% pendant 1 min chacune, puis deux incubations successives dans deux bains d'une solution d'éthanol 100% pendant 1 min également. Enfin, deux incubations de 3 min dans deux bains d'une solution de xylène ont été réalisées avant de faire le montage en utilisant la solution du montage Vectamount[®] (Eurobio Scientific, Les Ulis, France). Les lames ont été laissées toute la nuit à température ambiante et le lendemain des photos ont été prises à l'aide du microscope optique (LEICA DM 2500).

2.2. Analyse biochimique des tissus : Western blot

Parallèlement nous avons réalisé des analyses biochimiques (Western blotting) pour comparer au sein des valves l'expression de certaines protéines d'intérêt entre les zones calcifiées et les zones non calcifiées. Pour se faire, la partie de valve qui était séparée pour cet objectif a été encore divisée au scalpel en petits morceaux calcifiés et non calcifiés. Les morceaux calcifiés et non calcifiés d'une même valve ont été par la suite séparés dans deux tubes gentleMACs™ (Miltenyi Biotec) distincts. Les deux tubes ont été placés immédiatement sur la glace. Un dosage de calcium au crésol a été réalisé sur une prise d'essai de 25 µL dans chaque tube (cf. paragraphe 1.5. « Dosage du calcium »), afin de confirmer de manière objective la séparation parties calcifiées et parties non calcifiées. Puis, un volume de 400 µl de tampon de lyse NP-40 avec inhibiteurs (cf. paragraphe 1.9. « Extraction et quantification de protéines ») a été ajouté dans chaque tube contenant les morceaux de valve. Les tubes ont été ensuite mise en rotation dans le gentleMACs™ Octo Dissociator MACs (Miltenyi Biotec), afin de mixer les morceaux et les homogénéiser avec le tampon de lyse. Ces tubes ont été ensuite centrifugés à 16,1 g pendant 20 min. Les échantillons ont été transférés dans des eppendorfs de 1,5 ml, agités pendant 20 min, centrifugés pendant 30 min à 16060 g et enfin les surnageants contenant nos protéines ont été récupérés. Comme pour les cellules, les protéines ont été dosées à l'aide du kit de dosage des protéines DC™ (Bio-Rad). Des Western blots ont été ensuite réalisés, comme décrit précédemment pour les cellules (cf. paragraphe 1.10. « Western blot »), afin de comparer l'expression de certaines protéines entre les zones calcifiées et non calcifiées des valves.

3. Modèle de valves des porcs en culture

Afin de reproduire notre modèle in vitro des hVICs sur un modèle tissulaire de valves, nous avons travaillé sur des valves aortiques saines isolées de jeunes porcs. Ces valves présentent l'avantage d'être facilement disponibles et une histologie très proche des valves humaines (comprenant notamment les 3 structures *fibrosa*, *spongiosa* et *ventricularis*). Ainsi, des cœurs de porcs ont été récupérés de l'abattoir de la société BIGARD de Saint Pol sur Ternoise dans le Pas-de-Calais puis placés dans la glace et transportés immédiatement au laboratoire (délai maximum de 4h entre l'abattage et la dissection). À leur arrivée, ces cœurs ont été placés dans la salle de chirurgie, disséqués et les valves ont été prélevées à l'aide des instruments chirurgicaux. Ensuite, les trois feuilles valvulaires récupérés de chaque cœur ont

été rincées avec du sérum physiologique puis placées dans une boîte B100 contenant également du sérum pour éviter le séchage des tissus. Sous hôte stérile, ces valves ont ensuite été coupées en plusieurs morceaux à l'aide d'un scalpel. Les morceaux de valves ont alors été cultivés dans le DMEM complété par 10% de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% glutamax dans trois plaques 48 puits pour trois destinations différentes : la première plaque était destinée au dosage de calcium, la deuxième aux analyses histologiques et la dernière à une analyse biochimique. Le lendemain, ces morceaux de valves ont été traités, comme pour les hVICs, avec nos différentes conditions de traitement pendant 14 Jours. Le milieu de traitement a de même été changé tous les deux jours.

3.1. Dosage du calcium tissulaire

Après 14 jours de traitement, les différents morceaux de valves ont été incubés toute la nuit avec du HCl 0,6 N puis la quantité de calcium tissulaire a été mesurée comme cela a été décrit précédemment pour les hVICs (cf. paragraphe 1.5. « Dosage du calcium »). À la fin du dosage, les morceaux valvulaires ont été séchés à 37°C pendant toute la nuit pour être pesés le lendemain à la balance de précision.

Le contenu en calcium de la pièce valvulaire a alors été rapporté à la masse de tissu, pour chaque échantillon de chaque condition.

3.2. Analyse histologique

À partir de la plaque destinée aux analyses histologiques, les morceaux valvulaires ont été incubés toute la nuit avec du PFA 4% puis avec du sucrose 20% et 30% les deux jours suivants, en suivant le même protocole que celui décrit précédemment permettant l'immunomarquage des valves aortiques humaines. Après ces trois jours d'incubation, les morceaux valvulaires ont été plongés dans l'isopentane puis conservées à -80°C. Ensuite, ces échantillons ont été découpés au cryostat à 12 µm d'épaisseur sur des lames qui ont été conservées à -80°C jusqu'à utilisation ultérieure.

Comme pour les valves aortiques, une coloration au rouge alizarine a été réalisée pour comparer la calcification entre les différentes conditions de traitement. Un immunomarquage des tissus a été effectué sur les différents coupes des tissus, comme décrit précédemment pour

les valves aortiques (cf. paragraphe 2.1.b. « Immunomarquage des tissus ») en utilisant les deux anticorps : anti-MMP-12 (ref. SC-390863, Santa Cruz, dilution 1:100) et anti-elastine (ref. SC-58756, Santa Cruz, dilution 1:25).

3.3. Analyse biochimique des tissus : Western blot

Pour la plaque destinée au Western blot, les morceaux valvulaires ont été transférés dans des eppendorfs 1,5 ml, plongés dans l'isopentane puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation. L'extraction des protéines a été réalisée comme décrit précédemment pour les valves aortiques humaines (cf. paragraphe 2.2. « Analyse biochimique des tissus »). Ensuite, des Westerns blots ont été effectués sur les protéines extraits de ces morceaux valvulaires en utilisant des anticorps cités dans le (**Tableau 6**).

4. Modèle de valves de porc implantées en sous cutané chez le rat

Afin de tester *in vivo* l'effet du blocage pharmacologique de CXCR1/2 sur la calcification valvulaire, un modèle de calcification ectopique chez le rat a été employé dans le laboratoire en reproduisant les modalités décrites par *Levy et al.* [261]. Ce modèle est largement employé depuis les années 1980 dans l'évaluation de la calcification des bioprothèses.

4.1 Description générale du modèle

Le modèle a consisté en l'implantation par voie sous-cutanée chez des jeunes rats de valves aortiques porcines, préalablement incubées ou non au glutaraldéhyde (GA). En effet, le GA est un agent chimique de fixation largement employé dans l'industrie des bioprothèses valvulaires permettant de dévitaliser les tissus en les rendant imputrescibles pendant leur conservation (c'est-à-dire avant implantation) et en les tannant, ce qui renforce leur résistance aux contraintes mécaniques pendant et après leur implantation. Toutefois, la fixation au GA a été décrite comme un facteur de risque significatif de calcification des bioprothèses pouvant compromettre par conséquent leur durabilité à long terme.

4.2 Population de rats

Le protocole global a porté sur une population de vingt-quatre rats mâles de l'espèce *Sprague Dawley* âgés de 3 semaines qui ont été hébergés à l'animalerie agréée du Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS) d'Amiens. Dans ce modèle, le jeune âge des animaux a été décrit comme un facteur favorisant la calcification induite par la fixation au GA [94][262]. Le protocole de cette étude a été validé par le comité d'éthique local puis autorisé par le ministère de l'agriculture sous le numéro Apafis #19425 conformément à la directive européenne 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

4.3. Protocole d'implantation

Tout d'abord, des cœurs des porcs ont été récupérés de l'abattoir de la société BIGARD de Saint Pol sur Ternoise. Ces cœurs ont été placés dans la glace jusqu'à leur arrivée au laboratoire (délai maximum 4h entre l'abattage du porc et la dissection). Ces cœurs ont été disséqués puis chaque feuillet valvulaire a été par la suite rincé avec du sérum physiologique puis coupé en deux et placé dans son milieu d'attribution contenant aussi du sérum afin d'éviter le séchage des valves. Ces pièces valvulaires ont été ensuite traitées pendant une nuit au GA (ref. G5882, Sigma Aldrich) dilué à 0,6% dans une solution HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (ref. c-40020, Promo Cell) et stockées en chambre froide à 4°C. Plusieurs pièces supplémentaires ont servi de groupe contrôle «J1» pour les analyses biochimiques et histologiques de base avant implantation chez le rat. Le lendemain les valves ont été implantées du côté dorsale pour éviter le risque de lésion de grattage car les cicatrices sont moins accessibles chez les rats. Deux morceaux valvulaires d'environ 25 mm² provenant de 2 porcs différents ont été implantés dans chaque rat.

4.4. Protocole de traitement des rats

Après implantation des valves en sous cutané chez les rats, nous avons procédé au traitement des animaux avec l'antagoniste de CXCR1/2 : le SCH527123 (ref.331-10731-5, RayBiotech) à la dose de 1 mg/kg/jour. Pour cela les rats ont été divisés en trois groupes :

- Un groupe contrôle (non traité avec l'antagoniste)
- Un groupe traité par injection sous cutanée (SC) (locale) de l'antagoniste (0,5 mg/ml)

- Un groupe traité par injection intrapéritonéale (IP) de l'antagoniste (0,2 mg/ml)

Cette injection a été réalisée tous les jours pendant 14 jours. Ensuite, les rats ont été euthanasiés dans une chambre à CO₂ selon le protocole en vigueur au sein de l'animalerie et une ponction sanguine intracardiaque a été réalisée sur tube EDTA et sur tube sec avec activateur de la coagulation pour des analyses sanguines. Les fragments des valves ont été récupérés, rincés au PBS et à nouveau découpés en trois parties pour différentes analyses biochimiques et histochimiques.

4.5. Dosage du calcium

Afin de comparer le niveau de calcification entre les différents groupes des rats, le dosage du calcium au crésolphtaléine a été réalisé. Pour se faire, et comme décrit précédemment pour ce protocole, les fragments valvulaires ont été placés dans l'acide chlorhydrique (0,6 N) toute la nuit afin de décalcifier les tissus. Le lendemain, la concentration de calcium a été mesurée dans chaque puits en réalisant en parallèle une gamme d'étalonnage puis cette concentration a été normalisée par rapport à la masse sèche de chaque fragment de valve.

4.6. Analyses histochimiques

Pour les analyses histologiques, des fragments de valves dédiés ont été déshydratés, inclus en OCT puis conservés à -80°C. Ces fragments ont ensuite été coupés au cryostat à une épaisseur 12 µm et les lames ont été conservées à -80°C jusqu'à utilisation pour coloration au rouge Alizarine ou immunomarquage. Afin de comparer la calcification de valves issues des différents groupes des rats, une coloration au rouge d'alizarine, comme décrit précédemment, a été réalisée. Afin de comparer l'infiltration cellulaire chez les différents groupes des rats, des immunomarquages, comme décrit précédemment, ont été réalisées sur les coupes des valves en utilisant les trois anticorps suivants :

- Anti-CD-3 (ref. A0452, Dako). Dilution 1/100°
- Anti-CD-11b (ref. ab8879, Abcam). Dilution 1/1500°
- Anti-CD-68 (ref. MCA341R, AbD Serotec). Dilution 1/300°

4.7. Western blot

Pour comparer l'expression de certaines protéines entre les différents groupes de rats, des morceaux des valves dédiés ont été congelés à l'isopentane puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation. L'extraction des protéines a été réalisée conformément au protocole décrit précédemment à partir des valves humaines. Les Westerns blots ont été réalisés en incubant les membranes avec les anticorps suivants:

-Anti-MMP12 (ref. SC-390863, Santa Cruz). Dilution 1/500^e

-Anti élastine (ref. SC-166543, Santa Cruz). Dilution 1/200^e

-Anti élastine (ref. SC-58756, Santa Cruz). Dilution 1/500^e

4.8. Numération sanguine

La numération sanguine a été réalisée dans l'heure qui a suivi la ponction intracardiaque sur tube EDTA. L'analyse a été effectuée sur automate de diagnostic XN-10 de Sysmex et a inclus en particulier les numérations leucocytaire (lymphocytes, monocytes, polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles) et érythrocytaire.

5. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée avec GraphPad Prism Édition 6.01. Chaque expérience a été réalisée en utilisant un donneur différent de hVICs ou de valves. Les résultats sont reproductibles sur au moins trois expériences indépendantes. Les données ont été exprimées en moyenne \pm SEM. Un test t de Student ou une analyse de variance (ANOVA) suivi d'un test de Tukey ont été utilisés pour comparer 2 groupes ou au moins 3 groupes, respectivement. La valeur de P <0,05, <0,01, <0,001, <0,0001 (*, **, ***, ****, respectivement) ont été considérées comme significatives.

RÉSULTATS

1. Modèle cellulaire : hVICs en culture

1.1. Les récepteurs d'IL-8 (CXCR1/2) sont exprimés par les hVICs

L'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 de l'IL-8 par les hVICs n'était pas documentée dans la littérature. Nous avons donc vérifié tout d'abord l'expression de ces récepteurs par les hVICs à l'aide de deux techniques différentes : la cytométrie de flux et le Western blot.

Les données de cytométrie en flux montrent que les deux récepteurs CXCR1 et 2 sont fortement exprimés par les cellules sanguines CD15+ humaines utilisées comme cellules contrôles (**Figure 25A**), ainsi que par les hVICs primaires isolées des valves tricuspides aortiques humaines. Par ailleurs, CXCR1 et CXCR2 sont exprimés par $94,6 \pm 5,9$ et $98,7 \pm 2,1$ % des hVICs respectivement (n=6 patients différents) (**Figure 25B**).

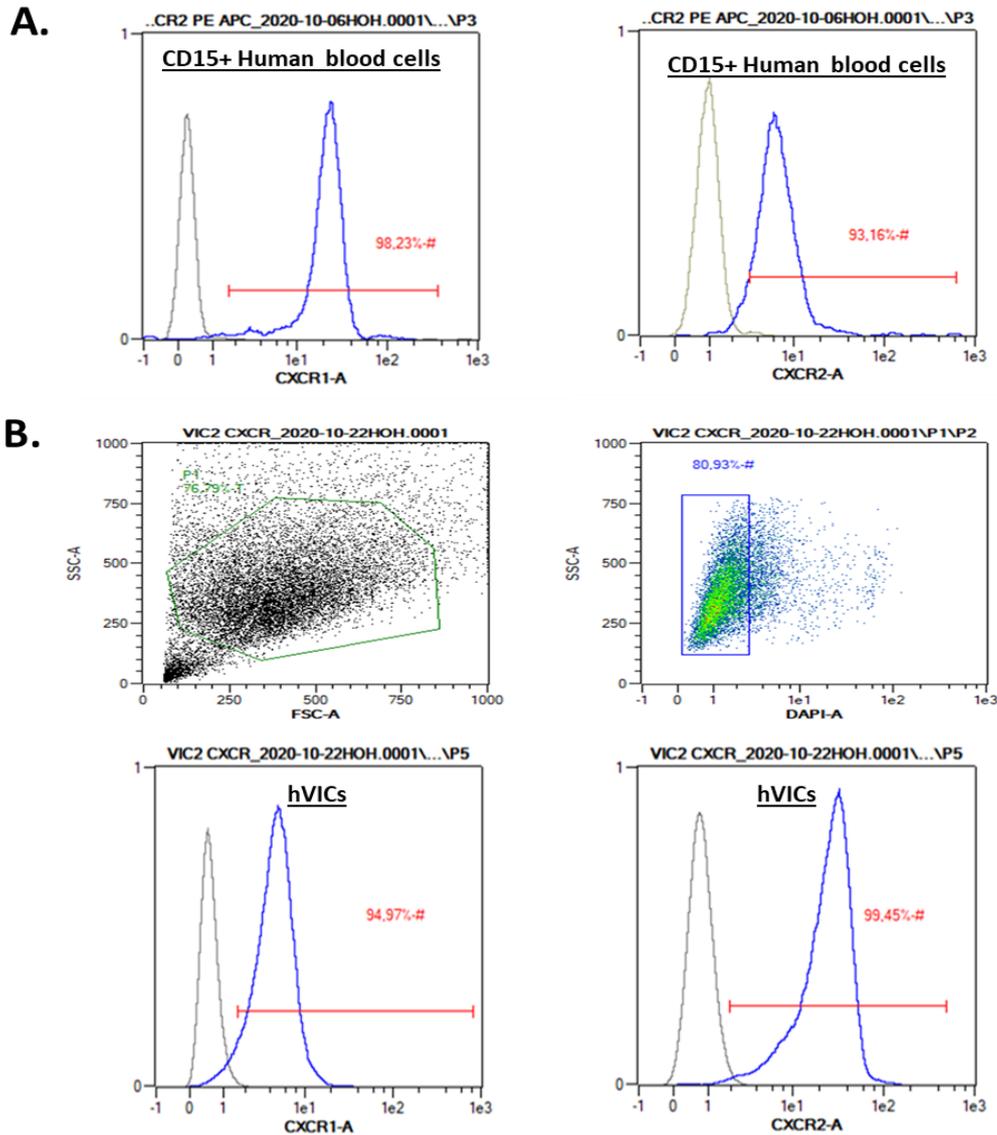


Figure 25 : Les hVICs expriment les récepteurs CXCR1/2

A- Analyse par cytométrie en flux montrant l'expression des récepteurs CXCR1/2 de l'IL-8 par des cellules sanguines CD15+ de donneurs sains (contrôle positif des récepteurs). **B-** Analyse par cytométrie en flux montrant l'expression des récepteurs CXCR1/2 par les hVICs. Les résultats sont représentatifs de 6 expériences indépendantes avec des résultats similaires.

Conformément à ces résultats, l'analyse par Western blot de l'expression de CXCR1/2 dans les extraits protéiques des hVICs provenant de trois patients différents a confirmé la présence de ces récepteurs dans ces cellules avec une bande d'environ 40 kDa pour CXCR1 et une bande de 41 kDa pour CXCR2. Cette expression est importante en comparaison avec

d'autres types cellulaires connus pour exprimer ces deux récepteurs (monocytes et cellules musculaires lisses) (**Figure 26**).

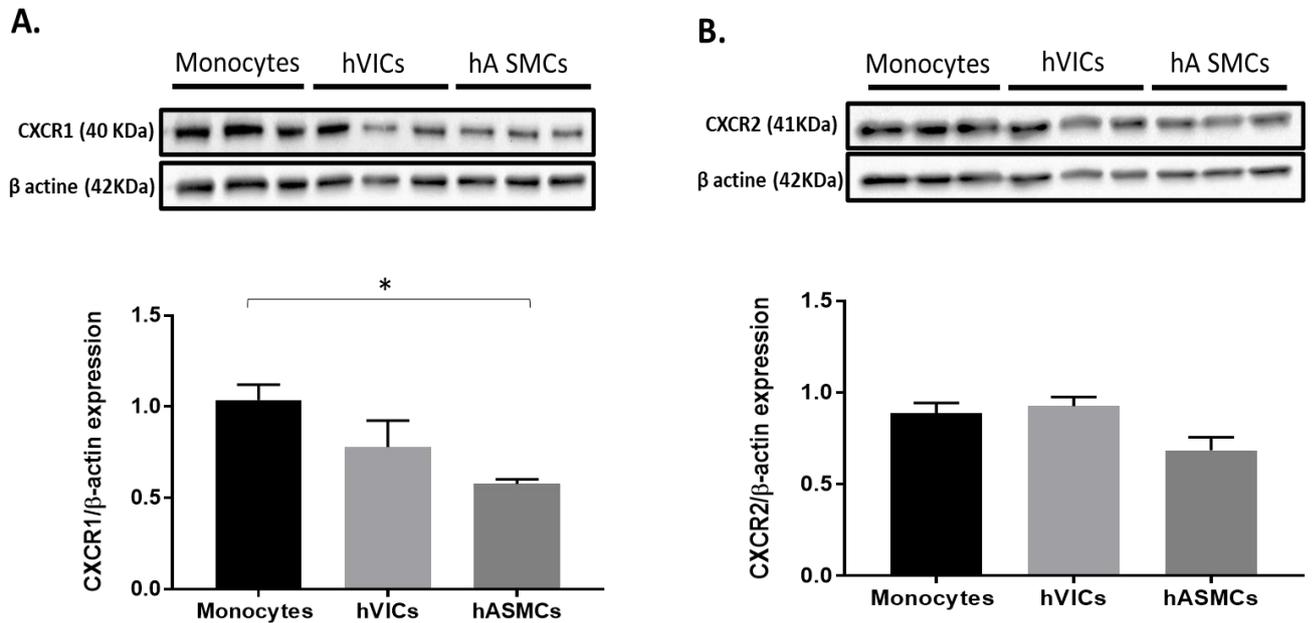


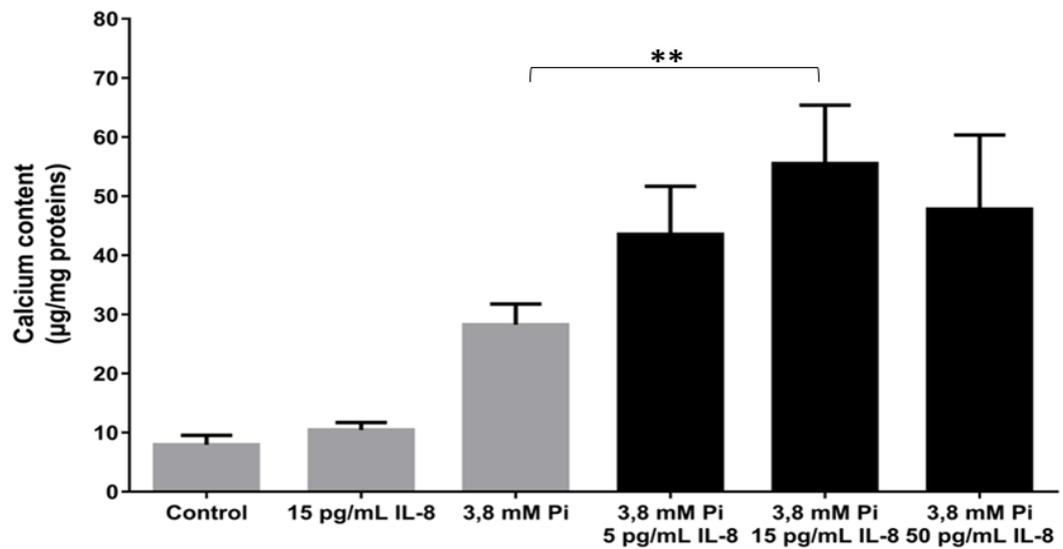
Figure 26 : les hVICs expriment les récepteurs CXCR1/2

Western blot montrant l'expression de CXCR1 (A) et CXCR2 (B) par les hVICs en comparaison avec d'autres cellules exprimant ces récepteurs: monocytes et cellules musculaires lisses aortiques (hASMC). Les cellules correspondant à chaque type cellulaire proviennent de 3 patients différents. * $p < 0,05$

1.2. L'IL-8 augmente la calcification des hVICs induite par le Pi et cet effet est prévenu par l'ajout de l'antagoniste SCH527123

Pour tester l'effet de l'IL-8 sur la calcification des hVICs, les hVICs ont été traitées avec des concentrations croissantes d'IL-8 (0 à 50 pg/mL) dans des conditions procalcifiantes (3,8 mM de phosphate) pendant 14 jours. À la fin du traitement, la coloration au rouge d'alizarine et le dosage de calcium ont montré que l'IL-8 augmente significativement la calcification des hVICs. Cette calcification était dépendante de la concentration d'IL-8 avec un effet maximal obtenu à 15 pg/ml (**Figure 27**).

A.



B.

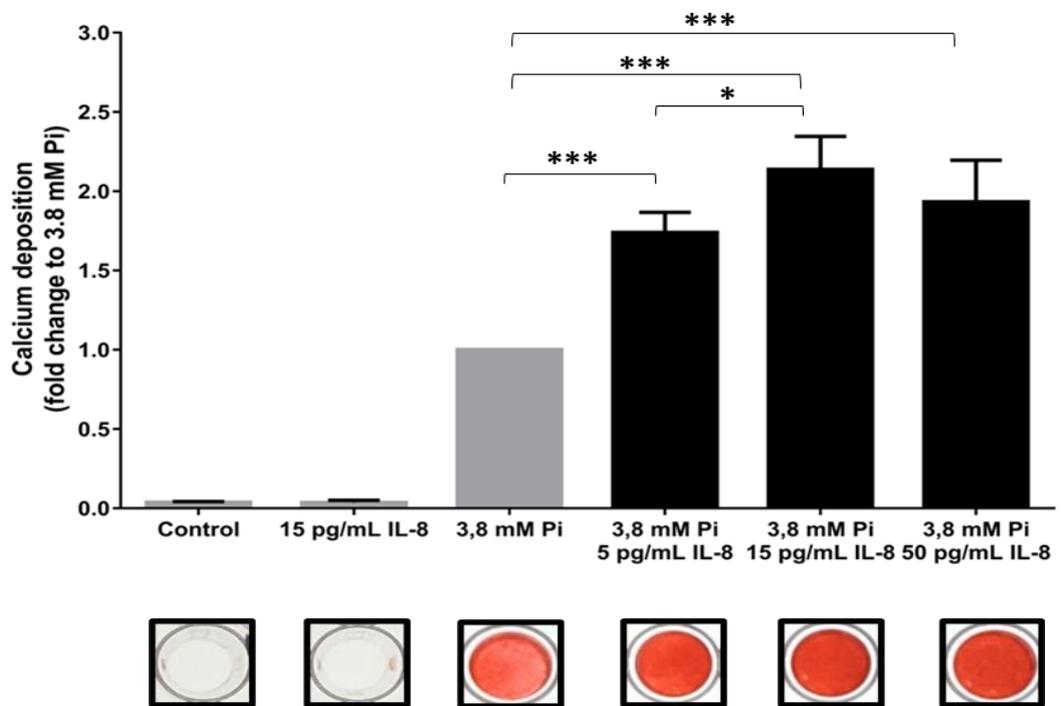


Figure 27 : L'IL-8 augmente la calcification induite par le Pi des hVICs

A- Dosage du calcium au créol **B-** Quantification et coloration au rouge alizarine après 14 jours de traitement des hVICs avec les différentes conditions de traitement: condition contrôle (milieu de base), IL-8 seule à 15 pg/ml, Pi seul à 3,8 mM ou en présence d'IL-8 à concentration croissante: 5, 15, 50 pg/ml. Les résultats expriment la moyenne \pm erreur type de la moyenne de 7 expériences indépendantes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ en comparaison avec la condition correspondante.

Le blocage des récepteurs d'IL-8 par l'ajout de 2 μM de l'antagoniste SCH527123 a réduit significativement cette calcification (**Figure 28A**).

Les hVICs ont également été traitées avec deux pools distincts de sérums, l'un provenant de volontaires sains et l'autre provenant de patients atteints de sténose valvulaire aortique sévère (1 % de sérum des patients dans le milieu de culture de base contenant 3,8 mM de phosphate) pendant 14 jours. Nous avons constaté que la calcification des hVICs augmente significativement avec le sérum des patients atteints de sténose valvulaire par rapport au sérum témoin. D'une façon significative, l'ajout de 2 μM de SCH527123 a limité cette calcification (**Figure 28B**).

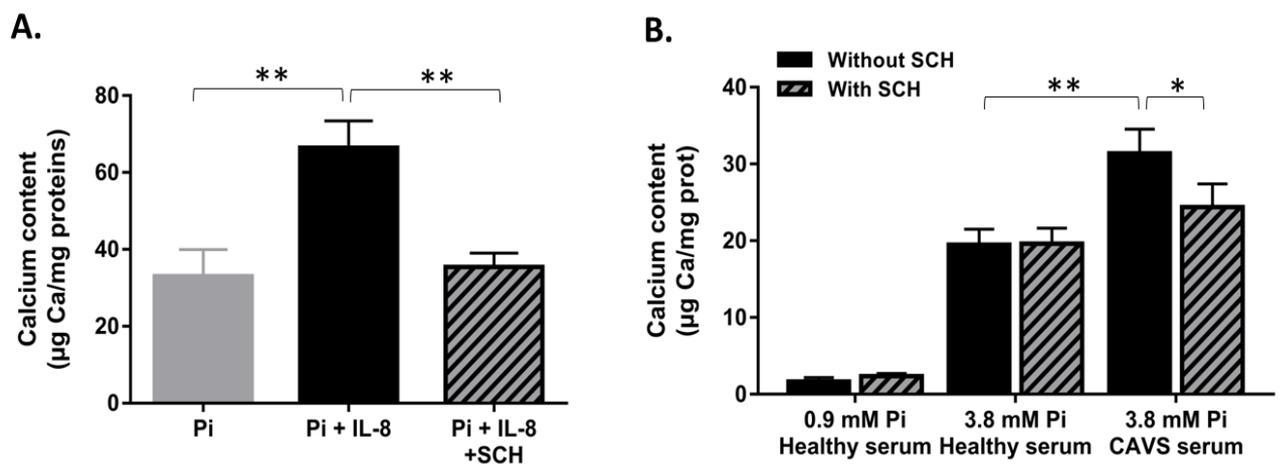


Figure 28 : L'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 (SCH527123) prévient la calcification des hVICs

A- Dosage du calcium pour des hVICs traitées avec: 3,8 mM Pi ; 3,8 mM Pi + 15 pg/ml d'IL-8 ; 3,8 mM Pi + 15 pg/ml d'IL-8 + 2 μM SCH527123 pendant 14 jours. **B-** Dosage du calcium pour des hVICs exposées pendant 14 jours au DMEM contenant 3,8 mM du Pi et 1% du sérum témoin ou provenant des patients atteints de sténose valvulaire aortique avec ou sans 2 μM de SCH527123. Les résultats expriment la moyenne \pm erreur type de la moyenne de 5 expériences indépendantes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ en comparaison avec la condition correspondante.

1.3. Effets de l'IL-8 sur la modulation des marqueurs ostéogéniques, myofibroblastiques et des métalloprotéases à activité élastase des hVICs

Afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel l'IL-8 augmente la calcification des hVICs, nous avons étudié l'impact de l'IL-8 sur l'expression des transcrits ARN de facteurs ostéogéniques, myofibroblastiques et métalloprotéases.

Les résultats de qRT-PCR réalisés après deux jours de traitement en présence de 15 pg/ml d'IL-8 et 3,8 mM de Pi montrent une augmentation significative de l'expression d'élastine et de la métalloprotéase MMP12 sous l'effet de l'IL-8 par rapport au Pi seul. À l'inverse, une diminution significative de l'expression d'ostéopontine a été observée sous l'effet de l'IL-8. En revanche, l'IL-8 n'a pas modulé significativement l'expression des autres marqueurs testés ostéogéniques (BMP2, OSX, ALP), myofibroblastiques (Alpha SMA, Collagène 1 et 3), et des métalloprotéases (MMP2 et MMP9) (**Tableau 7**).

Tableau 7 : L'IL-8 réduit l'expression d'OPN et favorise celle de MMP12 et d'élastine par les hVICs en condition pro-calcifiante

	Pi	Pi + IL-8	P-value
BMP2	1.42 ± 0.1	1.36 ± 0.13	0.7254
OSX	1.13 ± 0.07	1.26 ± 0.06	0.1756
ALP	1.15 ± 0.07	1.01 ± 0.05	0.1612
OPN	1.54 ± 0.1	1.06 ± 0.21	0.0063
Alpha-SMA	1.32 ± 0.15	1.18 ± 0.09	0.4675
Collagen 1	1.11 ± 0.03	1.18 ± 0.08	0.3106
Collagen 3	1.37 ± 0.13	1.41 ± 0.13	0.8551
Elastin	1.49 ± 0.17	2.38 ± 0.38	0.0409
MMP2	1.04 ± 0.13	0.81 ± 0.07	0.1895
MMP9	1.21 ± 0.33	0.86 ± 0.48	0.5773
MMP12	1.84 ± 0.25	3.36 ± 0.59	0.0292

Analyse de RT-qPCR montrant le niveau d'expression de différents gènes par les hVICs traitées pendant deux jours en présence de Pi à 3,8 mM avec ou sans 15 pg/ml d'IL-8. Les valeurs sont exprimées en comparaison avec la condition contrôle (milieu de base). Les résultats expriment la moyenne ± erreur type de la moyenne de 7 expériences indépendantes. Un $p \leq 0,05$ est considéré statistiquement significatif.

Ces effets significatifs sur l'expression de l'élastine et de MMP12 sont prévenus par l'ajout de 2 μ M de l'antagoniste SCH527123 (**Figure 29**).

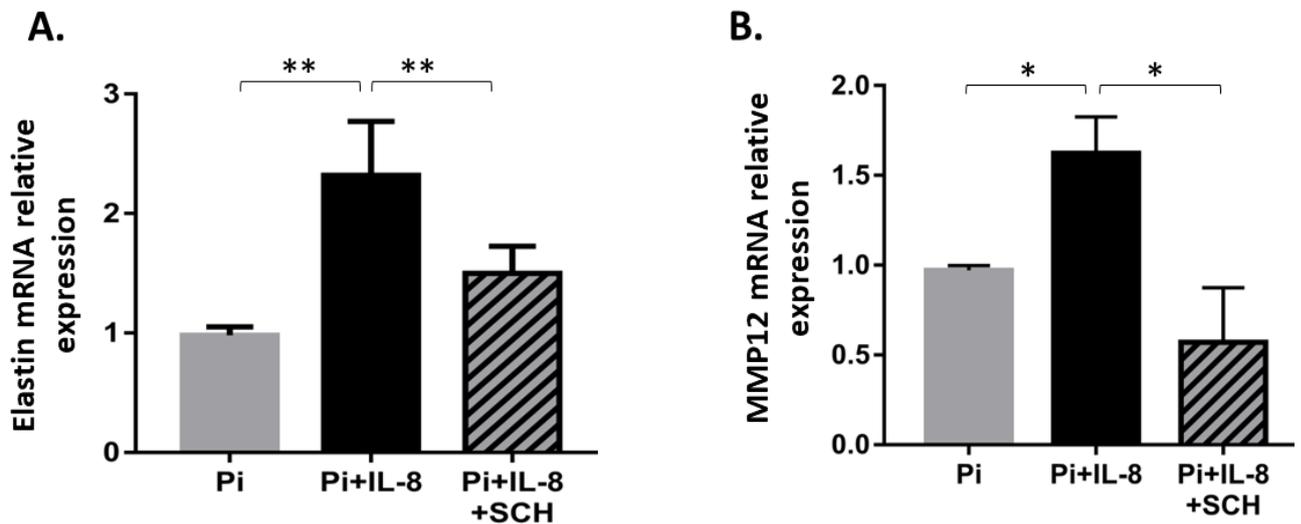


Figure 29 : L'antagoniste des récepteurs de l'IL-8 (SCH527123) prévient l'effet de l'IL-8 sur l'expression de l'élastine et de la MMP12 par les hVICs

Analyse RT-qPCR montrant la variation d'expression génique de l'élastine (A) et de MMP12 (B) par les hVICs traitées avec: 3,8 mM Pi ; 3,8 mM Pi+ 15 pg/ml d'IL-8 ; 3,8 mM Pi + 15 pg/ml d'IL-8 + 2 μ M SCH527123 (SCH) pendant 2 jours. Les résultats expriment la moyenne \pm erreur type de la moyenne de 6 expériences indépendantes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ en comparaison avec la condition correspondante.

Par ailleurs, une augmentation de l'expression de MMP12 a été confirmée par ELISA dans le milieu de culture des hVICs exposées à Pi + IL-8 par rapport au milieu des hVICs exposées à Pi seul. Une réduction non statistiquement significative de la sécrétion de MMP12 a été observée en bloquant CXCR1/2 avec le SCH527123 (**Figure 30**).

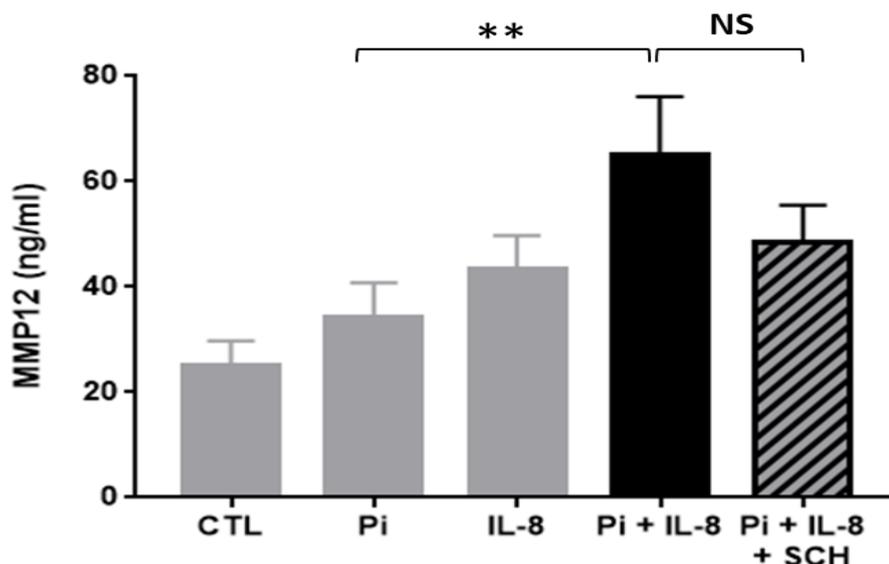


Figure 30 : L'IL-8 augmente la libération de MMP12 par les hVICs

Analyse d'Elisa montrant le niveau de sécrétion de MMP12 dans le milieu extracellulaire des hVICs traitées avec: 3,8 mM Pi ; 3,8 mM Pi + 15 pg/ml d'IL-8 ; 3,8 mM Pi + 15 pg/ml d'IL-8 + 2 μ M SCH527123 (SCH) pendant 2 jours. Les résultats expriment la moyenne \pm erreur type de la moyenne de 7 expériences indépendantes. ** $P < 0,01$ en comparaison avec la condition correspondante, NS : non significatif.

1.4. Rôle de MMP12 et de l'élastine dans la calcification des hVICs

Ayant trouvé un rôle d'IL-8 dans la modulation de l'expression d'élastine et de MMP12 nous nous sommes intéressés à explorer l'implication de ces deux protéines dans le mécanisme de calcification induite par l'IL-8. Le traitement des hVICs avec un inhibiteur de l'activité MMP12 (agent MMP-408 à 15 μ M) pendant 14 jours a montré une réduction importante de l'effet de l'IL-8 sur la calcification des cellules (**Figure 31A**). À l'inverse, le recouvrement préalable des boîtes de culture (*coating*) avec de l'élastine aortique humaine diluée a été associé à une majoration de l'effet procalcifiant de l'IL-8 sur les hVICs en comparaison à la culture sans élastine (**Figure 31B**).

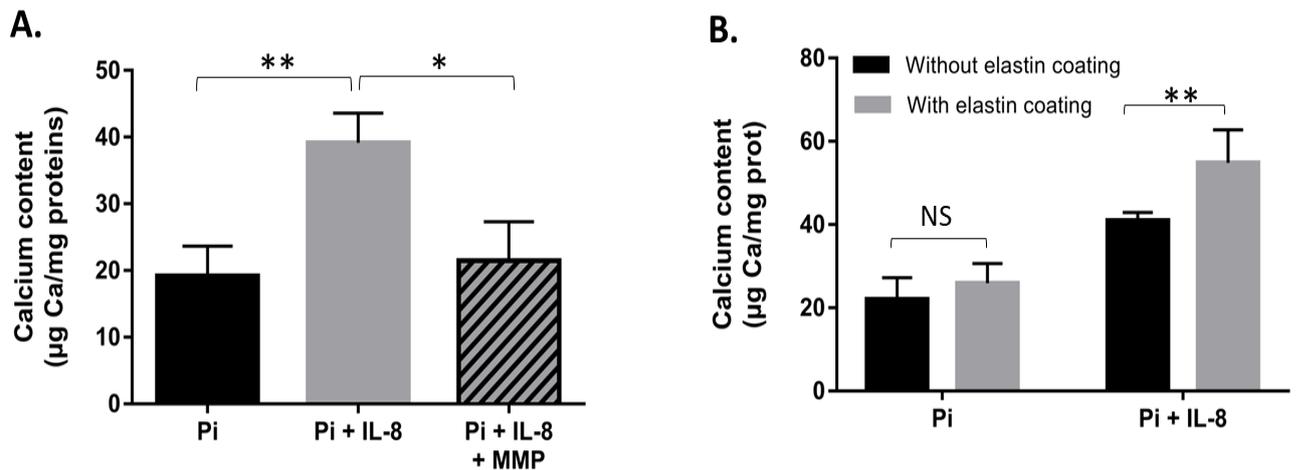


Figure 31 : L'effet de l'IL-8 sur la calcification dépend de MMP12 et de la présence de l'élastine

A- Dosage du calcium montrant l'effet de l'ajout d'un inhibiteur de l'activité MMP12 (agent MMP-408 à 15 µM ; MMP) sur des hVICs traitées avec du Pi à 3,8mM avec ou sans 15 pg/ml d'IL-8 pendant 14 jours de traitement. **B-** Dosage du calcium à partir des hVICs traitées pendant 14 jours par 3,8 mM du Pi avec ou sans 15 pg/ml d'IL-8 dans des boîtes préalablement « coatées » ou non avec 2 µg/ml d'élastine. Les résultats expriment la moyenne ± erreur type de la moyenne de 6 expériences indépendantes. *P < 0,05, **P < 0,01 en comparaison avec la condition correspondante, NS : non significatif.

1.5. L'IL-8 active la voie de signalisation NFκB par les hVICs

Afin d'explorer la voie de signalisation activée par l'IL-8 dans les hVICs, nous avons traité les hVICs pendant 30 min en présence ou non de 15 pg/ml d'IL-8 dans des conditions procalcifiantes (3,8 mM de phosphate). Nous nous sommes intéressés tout d'abord à la voie ERK qui, d'après la littérature, pourrait être activée par l'IL-8. Cependant, nous n'avons pas constaté d'effet significatif de l'IL-8 ou de l'IL-8 associée au Pi par rapport au Pi seul. En revanche, l'ajout d'IL-8 au Pi a induit une augmentation significative de l'activation de la voie NFκB par rapport au Pi seul. Cette activation a été marquée d'une part par la dégradation d'IKβ et d'autre part par la phosphorylation de P65 en présence d'IL-8. Par ailleurs, cette activation a été significativement réduite par l'ajout de l'antagoniste SCH527123 (**Figure 32**).

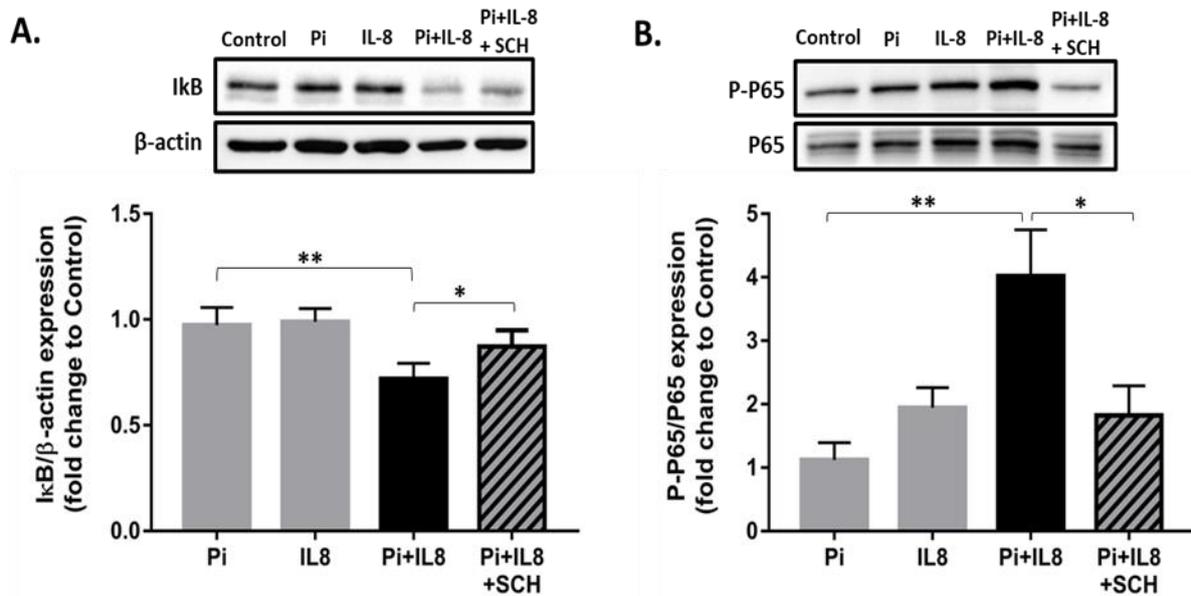


Figure 32 : L'IL-8 induit une activation de la voie NFκB, effet prévenu par l'antagoniste SH527123 de CXCR1/2

A- Analyse par Western blot montrant le rapport IkB/actine ou *B-* P-P65/P65 à partir des hVICs traitées pendant 30 min dans un milieu de culture de base, avec ou sans 3,8 mM Pi, avec ou sans 15 pg/ml d'IL-8 et avec ou sans 2μM de SH527123 (SCH). Les résultats expriment la moyenne ± erreur type de la moyenne de 5 expériences indépendantes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ en comparaison avec la condition correspondante.

1.6. Effet de l'inhibition de la voie NFκB sur les effets de l'IL-8

Ayant mis en évidence l'activation de la voie NFκB par l'IL-8 dans les hVICs, il nous est apparu intéressant de tester l'effet de l'inhibition de cette voie sur les effets de l'IL-8 notamment sur la calcification et la modulation de l'expression génique de MMP12 et d'élastine. Le traitement des hVICs pendant 14 jours avec 15 pg/ml d'IL-8 et 3,8 mM de Pi en présence d'un inhibiteur de la voie NFκB (agent JSH-23 à 15 μM) provoque une diminution significative de la calcification (**Figure 33 A**). De même, l'effet stimulant de l'IL-8 sur l'expression de l'élastine et de MMP12 en qRT-PCR a été réduit après l'ajout de 15 μM de JSH-23 pendant deux jours de traitement (**Figure 33 B et C**).

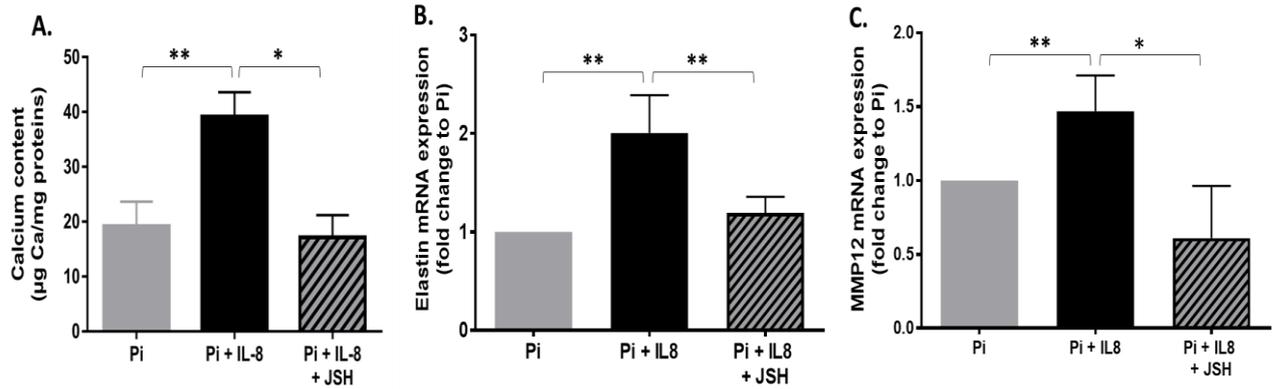


Figure 33 : L'inhibition de la voie NFκB réduit l'effet de l'IL-8 sur la calcification et l'expression de MMP12 et d'élastine

A-Dosage du calcium montrant l'effet de traitement des hVICs pendant 14 jours avec 15 µM d'un inhibiteur de la voie NFκB (JSH 23, JSH) en présence de Pi à 3,8mM et d'IL-8 à 15 pg/ml. B et C-Analyse par qRT-PCR montrant l'effet de l'ajout de 15 µM de JSH 23 en présence de Pi à 3,8 mM et d'IL-8 à 15 pg/ml pendant 2 jours sur l'expression génique de l'élastine (B) et de MMP12 (C). Les résultats expriment la moyenne ± erreur type de la moyenne de 5 expériences indépendantes. *P < 0,05, **P < 0,01 en comparaison avec la condition correspondante.

1.7. Effet de l'IL-8 sur la dégradation de l'élastine

Nos résultats montrent un rôle significatif de l'élastine et de la MMP12 sur la calcification des hVICs. Or, la MMP12 est une métalloprotéase à activité élastase et la dégradation de l'élastine est un processus déjà décrit comme favorisant les calcifications cardiovasculaires. Nous avons donc évalué l'effet de l'ajout d'IL-8 au Pi sur la dégradation de l'élastine produite par les hVICs en culture. Pour cela, nous avons cultivé des hVICs pendant 48 heures en présence de 3,8 mM de Pi avec ou sans 15 pg/ml d'IL-8 et avec ou sans 2 µM de l'antagoniste SCH527123. De plus, nous avons évalué l'effet de l'inhibition de la métalloprotéase MMP12 et de la voie NFκB par ajout de 15 µM de l'agent MMP-408 et de 15 µM de l'agent JSH-23 respectivement. Nos résultats montrent que l'IL-8 favorise la dégradation de l'élastine. Une augmentation de l'expression d'une forme dégradée de l'élastine (45 KDa) par rapport à la forme intacte (65 KDa) est observée en ajoutant l'IL-8 au Pi par rapport au Pi seul. Cette dégradation diminue soit en bloquant les récepteurs de l'IL-8

par l'ajout du SCH527123, soit en inhibant la métalloprotéase MMP12 ou la voie NFkB (Figure 34).

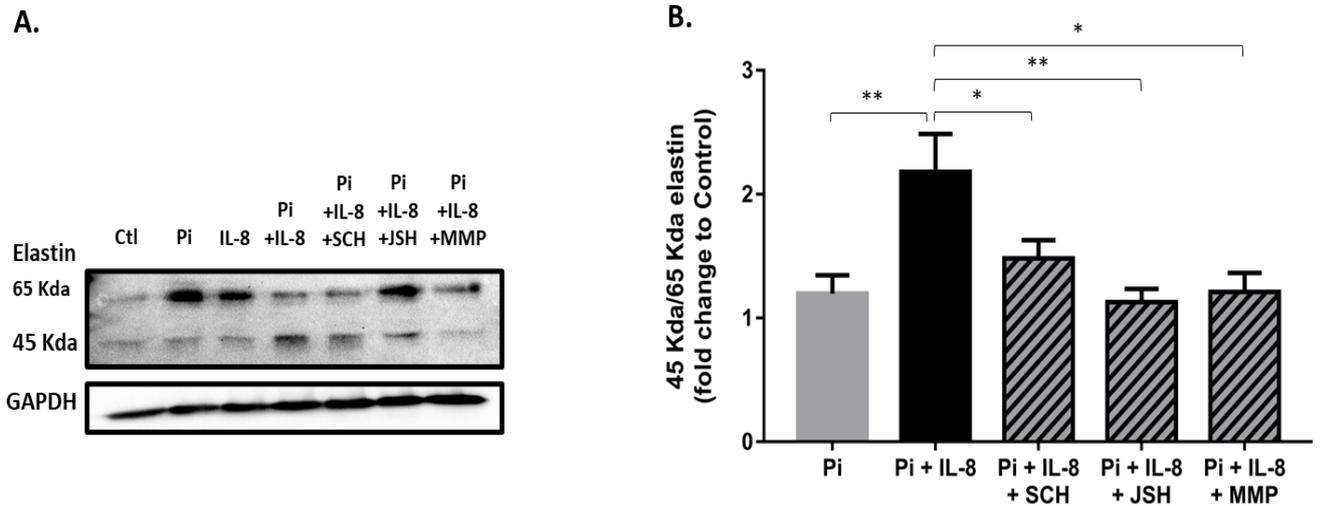


Figure 34 : L'IL-8 induit une dégradation de l'élastine, effet prévenu en bloquant les récepteurs CXCR1/2, la voie NFkB ou la métalloprotéase MMP12

A-Membranes et B- quantification des Westerns blots réalisés à partir de lysats de hVICs après 48h de traitement avec 3,8 mM Pi avec ou sans IL-8 à 15 pg/ml, SCH527123 (SCH) à 2 µM, JSH-23 (JSH) à 15 µM ou MMP-408 (inhibiteur de MMP12, MMP) à 15 µM. Les membranes ont été incubées avec un mélange de deux anticorps reconnaissant une forme d'élastine à 65 KDa (tropoélastine intacte) et une forme d'élastine clivée à 45 KDa. Les résultats expriment la moyenne ± erreur type de la moyenne de 8 expériences indépendantes. *P < 0,05, **P < 0,01 en comparaison avec la condition correspondante.

2. Analyse des valves aortiques de patients atteints de RAC

L'analyse histologique des valves de patients atteints de RAC ayant subi un RVA chirurgical a confirmé l'expression de CXCR1, CXCR2 et de la métalloprotéase MMP12 dans ces tissus (**Figure 35**). De plus, nous avons constaté que cette expression de CXCR1/2 et MMP12 est plus marquée dans les zones calcifiées par rapport aux zones non calcifiées identifiées par la coloration au rouge d'alizarine réalisée sur des coupes adjacentes (**Figure 35A, B et C**). À l'inverse, l'utilisation d'un anticorps ne reconnaissant que la forme intacte de l'élastine a permis de mettre en évidence une expression réduite de celle-ci dans les zones calcifiées par rapport aux non calcifiées (**Figure 35D**).

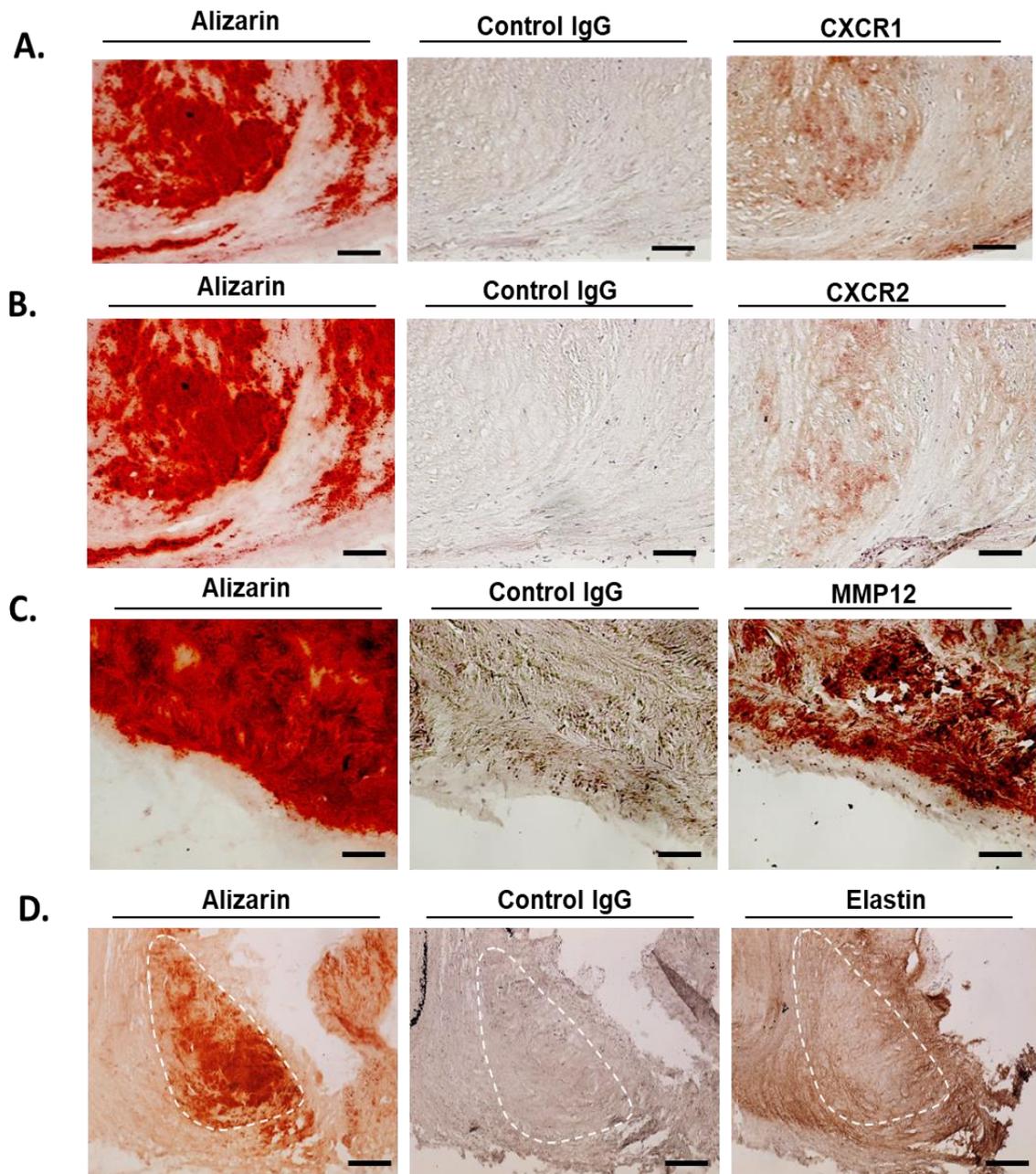


Figure 35 : L'expression de *CXCR1*, *CXCR2* et *MMP12* est plus marquée dans les zones calcifiées des valves aortiques des patients atteints de RAC et est associée à une moindre expression de l'élastine intacte

Marquage immunohistochimique pour *CXCR1*, *CXCR2*, *MMP12* et élastine qui montre une colocalisation entre les zones colorées par le rouge alizarine et **A**-*CXCR1*, **B**-*CXCR2*, **C**-*MMP12*, et une colocalisation entre les zones faiblement colorées avec le rouge alizarine et **D**-la forme intacte d'élastine. Un anticorps isotype control (control IgG) est utilisé pour chaque marquage afin de confirmer la spécificité des anticorps. Barres d'échelle : 100 μ m. Les photos sont représentatives de 4 patients différents.

Afin de quantifier ces observations histologiques, des Westerns blots ont été réalisés en séparant visuellement les parties calcifiées et non calcifiées de chaque valve. Afin de vérifier que nous avons bien séparé les parties calcifiées de celles non calcifiées, nous avons réalisé un dosage de calcium dans le broyat de ces 2 zones. Ce dosage a confirmé un taux de calcium beaucoup plus important dans les parties calcifiées par comparaison avec les parties non calcifiées (**Figure 36**).

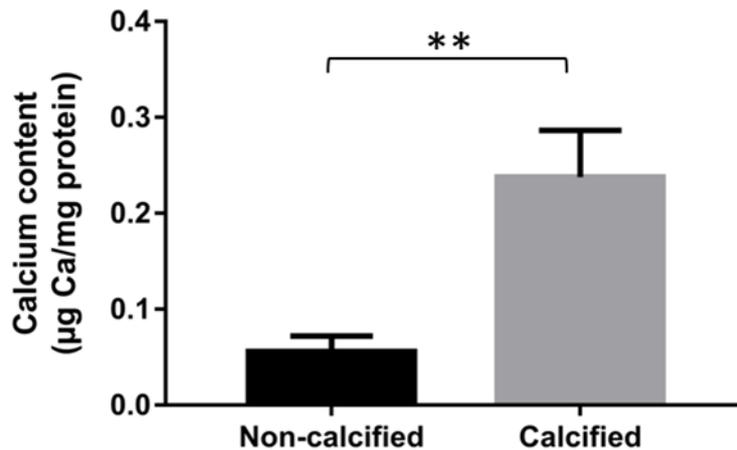


Figure 36 : Les zones calcifiées des valves contiennent objectivement plus de calcium que les zones non calcifiées

Contenu en calcium des parties calcifiées et non calcifiées des valves aortiques isolées de patients atteints de RAC. Les résultats expriment la moyenne \pm erreur type de la moyenne de 5 patients différents. $**P < 0,01$ en comparaison avec la condition correspondante.

Nous avons par la suite réalisé des Westerns blots qui ont montré, conformément aux résultats histologiques, des bandes correspondantes aux protéines CXCR1, CXCR2 et MMP12 (40, 41 et 47 KDa respectivement) plus intenses dans les extraits protéiques issus des zones calcifiées par rapport aux zones non calcifiées des valves (**Figure 37A, B et C**). Par ailleurs, nous observons une augmentation d'une forme dégradée d'élastine (45 KDa) par rapport à la forme intacte (67 KDa) dans les zones calcifiées des valves comparativement aux zones non calcifiées (**Figure 37D**).

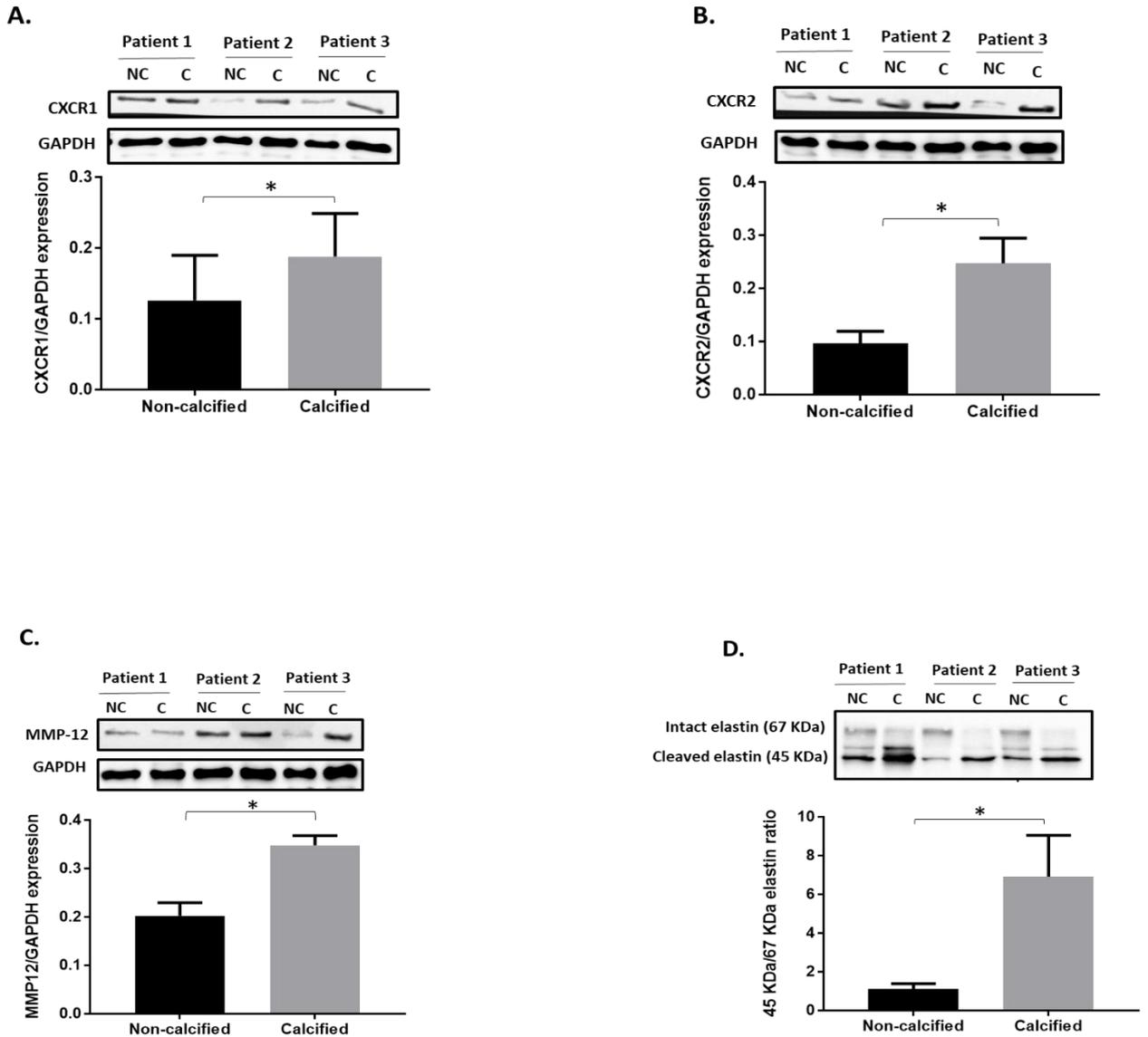


Figure 37 : L'expression de CXCR1, CXCR2, MMP12 et de la forme dégradée d'élastine est plus importante dans les zones calcifiées que dans les zones non calcifiées des valves des patients atteints de RAC

Westerns blots montrant une expression plus importante de A-CXCR1, B-CXCR2, C-MMP-12 et d'élastine dégradée dans les zones calcifiées des valves par rapport aux zones non calcifiées. D-Les membranes sont incubées avec un mix de 2 anticorps, l'un reconnaissant la forme intacte de l'élastine (bande à 67 KDa) et l'autre reconnaissant une forme dégradée (bande 45 KDa). Les valves sont obtenues à partir des cinq patients différents. $P < 0.05$, $**P < 0.01$ versus parties non calcifiées des valves.

3. Modèle de valves de porcs en culture

Afin de confirmer les effets de l'IL-8 observés sur les hVICs dans un modèle tissulaire, nous avons isolé des valves aortiques à partir de cœurs de porcs sains (dont l'anatomie présente des similitudes avec les valves humaines) et les avons soumises aux conditions de traitement précédemment évaluées en culture cellulaire.

Les résultats montrent que la calcification des valves de porc en culture induite par 3,8 mM de Pi a été significativement augmentée après addition de 15 pg/ml d'IL-8 et que l'ajout de 2 μ M de l'antagoniste de CXCR1/2 (SCH527123), de 15 μ M d'inhibiteur de MMP12 (MMP-408) ou de 15 μ M d'inhibiteur de NF κ B (JSH-23) a réduit significativement cette calcification (**Figure 38**).

L'immunomarquage des coupes de ces valves a montré une augmentation de l'expression de la métalloprotéase MMP12 en présence de Pi + IL-8 par rapport à Pi seul. Cet effet semblait limité en présence de 2 μ M d'antagoniste CXCR1/2 (SCH527123), de 15 μ M d'inhibiteur de MMP12 (MMP408) ou de 15 μ M d'inhibiteur de NF κ B (JSH-23). À l'inverse, le marquage de la forme intacte de l'élastine a été réduit dans la condition Pi + IL-8 par rapport à Pi seul, et rehaussé avec l'ajout de 2 μ M d'antagoniste CXCR1/2 (SCH527123), de 15 μ M d'inhibiteur de MMP12 (MMP408) ou de 15 μ M d'inhibiteur de NF κ B (JSH-23).

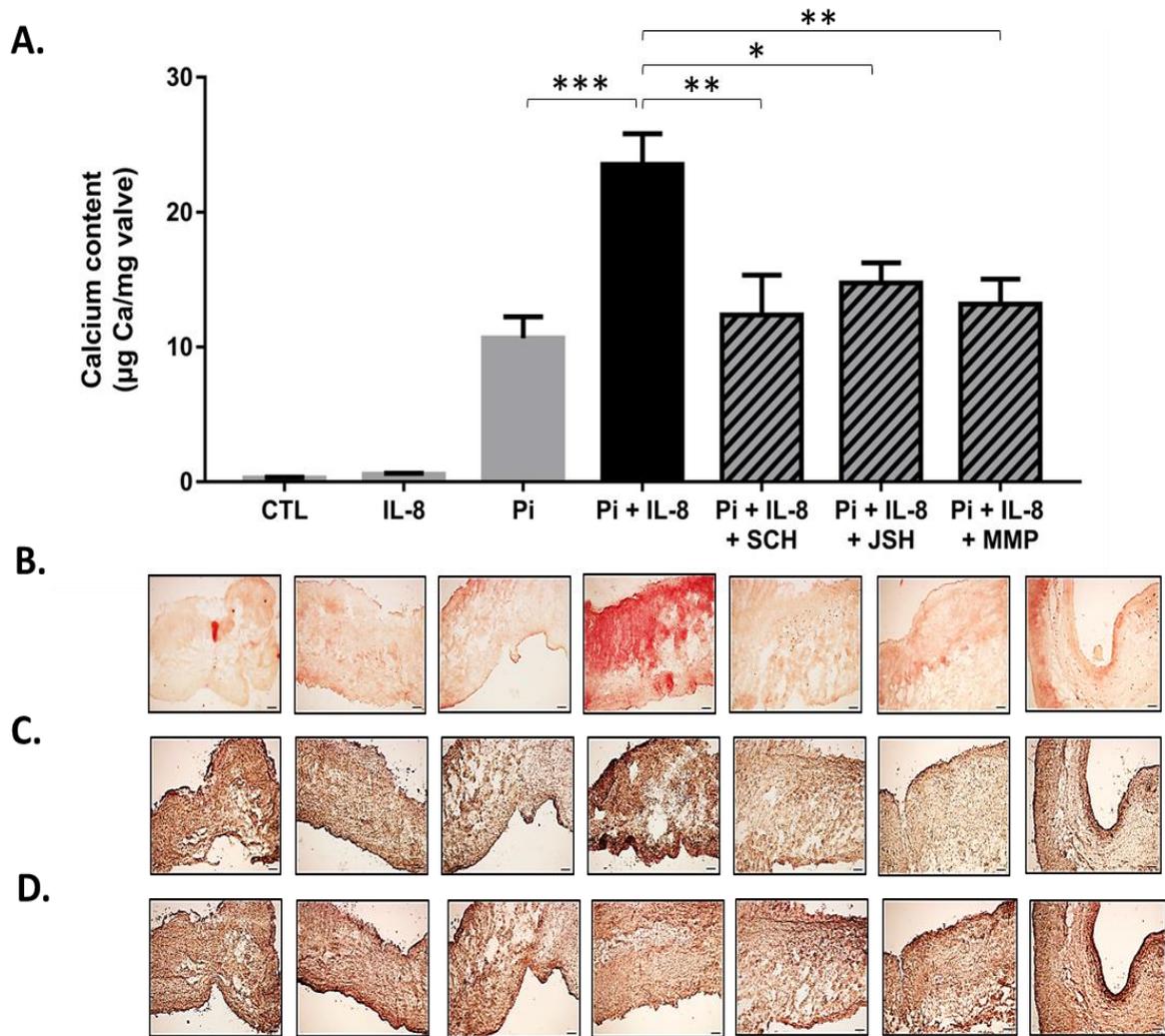


Figure 38 : L'IL-8 favorise la calcification induite par Pi des valves aortiques porcines en culture, l'expression de MMP12 et la dégradation d'élastine et ces effets sont prévenus par le blocage de CXCR1/2, l'inhibition de la voie NFκB ou de la métalloprotéase MMP12

A-Teneur en calcium dosée par la méthode o-crésolphthaléine dans des morceaux de valves aortiques porcines cultivées pendant 14 jours dans un milieu de base ou contenant 3,8 mM Pi, 15 pg/ml IL-8, 3,8 mM Pi + 15 pg/ml IL-8, 3,8 mM Pi + 15 pg/ml IL-8+ 2 µM SCH527123, 3,8 mM Pi + 15 pg/ml IL-8+15 µM JSH-23 ou 3,8 mM Pi + 15 pg/ml IL-8 + 15µM MMP-408. Les résultats expriment la moyenne ± erreur type de la moyenne de 6 valves aortiques porcines différentes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ en comparaison avec la condition correspondante. **B**-Coloration rouge alizarine représentative des coupes histologiques des valves aortiques porcines dans les différentes conditions de traitement. **C/D**- Immunomarquage de **C**-MMP-12 et **D**-élastine intacte sur coupes de valves aortiques porcines montrant l'effet des différentes conditions de traitement sur l'expression de chaque protéine. Les photos sont représentatives de 3 porcs différents. Barre d'échelle: 100 µm.

Grossissement:x10

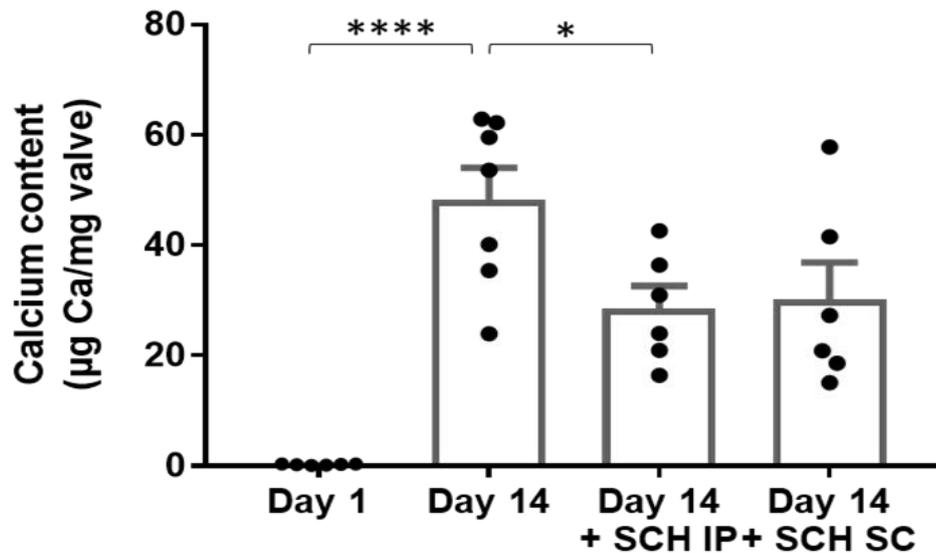
4. Modèle de valves de porc implantées en sous cutané chez le rat

4.1. Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit la calcification des valves

Afin de vérifier que les valves implantées n'ont pas été déjà calcifiées et que la calcification était produite pendant les deux semaines suivant l'implantation, une comparaison de la calcification par dosage au crésol et par coloration alizarine a été réalisée entre le groupe des valves non implantées à J1 et les valves implantées non traitées (du groupe contrôle) après explantation à J14. Cette comparaison montre une augmentation de la calcification dans les valves implantées par rapport à celles non implantées du J1 (**Figure 39**).

Par ailleurs, les résultats du dosage et de coloration alizarine des valves explantées après 14 jours du traitement avec l'antagoniste SCH527123 montre une réduction importante de la calcification chez le groupe des rats traités en IP par rapport au groupe control non traité (réduction significative, $P=0,043$). De même, le groupe des rats traités en SC montre une diminution importante de la calcification qui demeure pourtant non significative ($P=0,07$) (**Figure 39**).

A.



B.

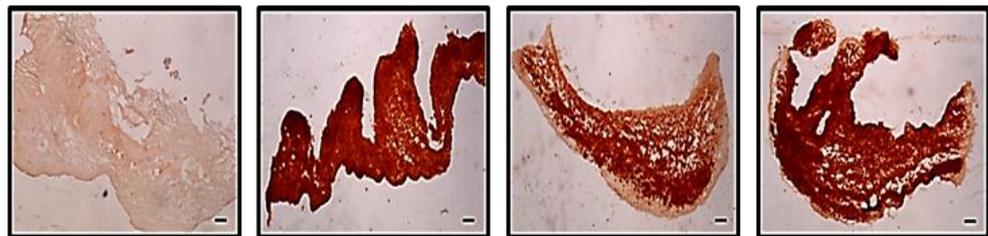


Figure 39 : Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit la calcification des valves

A- Dosage du calcium **B-** Coloration au rouge alizarine pour les différents groupes des valves: les valves non implantées dont le dosage du crésol a été réalisé à J1, les valves implantées chez le groupe des rats non traitées ou traitées (en IP ou SC) pendant 14 jours avec l'antagoniste SCH527123. Les résultats sont représentatifs de la moyenne \pm erreur type de la moyenne de six rats. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0001$ en comparaison avec la condition correspondante. Grossissement : $\times 5$. Barre d'échelle : $100\mu\text{m}$.

4.2. Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit l'hyperleucocytose sanguine

Afin d'étudier la réponse inflammatoire systémique, nous avons analysé la numération sanguine chez les différents groupes des rats. L'analyse des tubes contenant le sang prélevé par ponction sanguine intracardiaque après l'euthanasie des rats des différents groupes montre une réduction de l'infiltration sanguine des lymphocytes et des monocytes circulantes après traitement avec l'antagoniste SCH527123 par rapport au groupe contrôle (**Figure 40**).

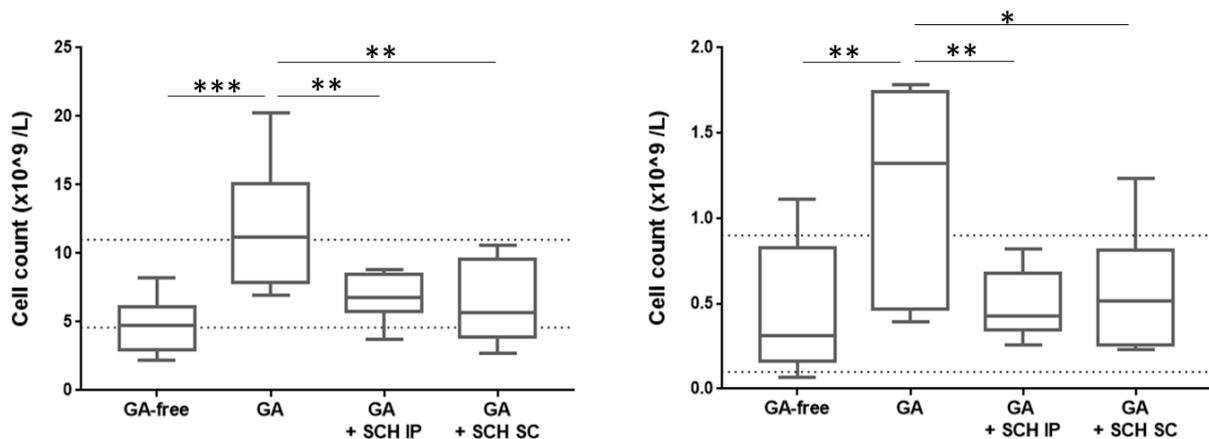


Figure 40 : Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit l'hyperleucocytose sanguine

A-Numération sanguine de lymphocytes et de *B*-monocytes circulants dans le sang récupéré des rats des différents groupes : les rats implantés avec les valves non incubées avec du GA(GA-free), les rats non traitées ou traités (en IP ou SC) pendant 14 jours avec l'antagoniste SCH527123. Les résultats sont représentatifs de la moyenne \pm erreur type de la moyenne de six rats. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ en comparaison avec la condition correspondante. Grossissement :x5. Barre d'échelle :100 μ m.

4.3. Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit l'infiltration dans les valves de certaines cellules inflammatoires

Afin de comprendre le mécanisme favorisant la calcification des valves implantées en sous cutanées chez les rats puis sa réduction après traitement avec l'antagoniste SCH527123, des immunomarquages des coupes des valves des différents groupes ont été réalisés et montrent une augmentation importante d'infiltration de certaines cellules inflammatoires tel que les monocytes (marquage du CD-68), les granulocytes (marquage du CD-11b) et des lymphocytes (marquage du CD-3) des valves implantées en SC chez les rats par rapport aux valves non implantées (du J1). Cette infiltration cellulaire diminue dans les groupes des rats traités avec SCH527123 où le marquage de CD-3, CD-11b et CD-68 est fortement réduite dans les valves correspondantes à ces groupes (**Figure 41**).

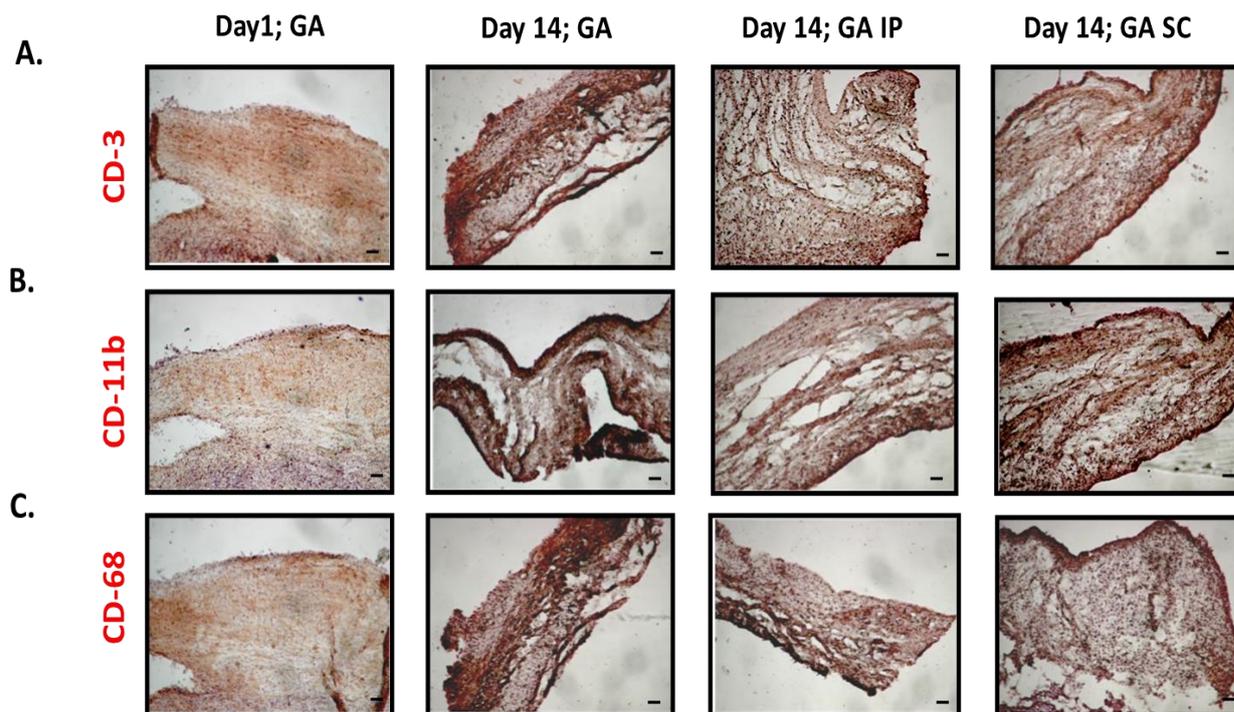


Figure 41 : Le traitement avec l'antagoniste SCH527123 réduit l'infiltration de certaines cellules inflammatoires dans les valves implantées en SC

A-Immunomarquage de CD-3 : marquage identifiant les lymphocytes, B-de CD-11b : marquage identifiant les granulocytes, et du C-CD-68 : marquage identifiant les monocytes des coupes des valves des différents groupes: les valves non implantées de J1, les valves implantées chez le groupe des rats non traitées ou traités (en IP ou SC) pendant 14 jours avec l'antagoniste SCH527123. Les résultats sont représentatifs des valves provenant de quatre rats différents avec des résultats similaires. Grossissement x5. Barre d'échelle:100µm.

DISCUSSION

L'objectif de notre étude était de montrer le rôle de l'IL-8 dans la calcification valvulaire aortique. En résumé, nous avons montré que les hVICs expriment les récepteurs CXCR1 et 2 de l'IL-8. Leur traitement avec 15 pg/ml d'IL-8 en présence de 3,8 mM de Pi active la voie NFkB, augmente l'expression et la sécrétion de la métalloprotéase MMP12, augmente la synthèse et la dégradation de l'élastine et favorise ainsi la calcification. Cette calcification est prévenue en bloquant pharmacologiquement CXCR1/2, la voie NFkB, ou la métalloprotéase MMP12. En histologie, l'expression de CXCR1 et CXCR2 a été confirmée dans les valves des patients atteints de RAC et une expression plus importante de CXCR1, CXCR2 et MMP12 a été mise en évidence dans les zones calcifiées en comparaison avec les zones non calcifiées. Parallèlement, l'expression de la forme intacte d'élastine est réduite dans les zones calcifiées par rapport aux zones non calcifiées suggérant sa dégradation observée en Western blot. Dans un modèle de valves de porcs en culture, l'effet amplificateur de l'IL-8 sur la calcification induite par le Pi a été confirmé. Cet effet a été prévenu en bloquant pharmacologiquement CXCR1/2, NFkB ou la MMP12. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'IL-8 et ses récepteurs CXCR1/2 seraient impliqués dans la progression de la calcification de la valve aortique par un mécanisme en partie lié à la dégradation de l'élastine consécutive de l'activation des hVICs. Par ailleurs, dans un modèle d'implantation sous cutanée chez le rat de feuillets valvulaires aortiques issus de porc, nous avons pu mettre en évidence un effet préventif significatif de l'administration quotidienne d'un antagoniste de CXCR1/2 (SCH52123) par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée locale. Cet effet préventif était associé à une moindre réaction leucocytaire. Ce modèle, employé notamment dans l'évaluation de la durabilité des bioprothèses valvulaires industrielles, suggère que le blocage pharmacologique de CXCR1/2 pourrait également agir *in vivo* en limitant la calcification associée au chimiotactisme leucocytaire.

Jusqu'à ce jour, aucune étude n'avait exploré le rôle de l'IL-8 dans la physiopathologie de la calcification valvulaire. Au cours d'un travail précédemment réalisé dans notre laboratoire, il a été montré que l'IL-8, sécrétée par les cellules endothéliales exposées aux toxines urémiques, favorise la calcification *in vitro* des cellules musculaires lisses aortiques. Le traitement de ces dernières avec un antagoniste des récepteurs de l'IL-8 (SCH527123) a réduit significativement cette calcification. Un résultat similaire a été rapporté dans un modèle d'aortes de rats en culture [155]. Dans notre travail actuel nous avons fait l'hypothèse que l'IL-8 amplifierait également la calcification des hVICs aortiques, et que le blocage des récepteurs de l'IL-8 pourrait réduire cette calcification.

Expression de CXCR1/2 par les hVICs

Pour valider l'hypothèse d'un effet de l'IL-8 sur la calcification valvulaire aortique, nous avons travaillé sur des hVICs isolées à partir des valves humaines des patients ayant subi un remplacement valvulaire chirurgical. À notre connaissance, aucune étude, à ce jour, n'avait montré l'expression par les hVICs des récepteurs CXCR1 et 2 de l'IL-8. Nous avons tout d'abord analysé l'expression de ces récepteurs par Western blot et cytométrie de flux. En Western blot, CXCR1 et 2 sont identifiés par des bandes de poids moléculaire similaire à environ 42 et 41 KDa respectivement [263–265]. D'après les résultats obtenus, les hVICs expriment ces deux récepteurs. Cette expression est importante en comparaison avec d'autres types cellulaires analysés exprimant également ces récepteurs : les cellules musculaire lisses vasculaires [266] et les monocytes THP1 [174]. En cytométrie de flux, nous avons confirmé cette expression en comparaison avec les cellules sanguines CD15+, qui représentent majoritairement les polynucléaires neutrophiles, c'est-à-dire les principales cellules connues pour exprimer CXCR1 et CXCR2 [159][267][268]. Ainsi, nous avons pu montrer l'expression de CXCR1/2 sur les hVICs par deux techniques différentes et l'utilisation de plusieurs contrôles positifs. Toutefois, la démonstration aurait pu être complète en comparant les bandes de Western blot obtenues à partir des lysats cellulaires avec celles des récepteurs recombinants purifiés, ou en analysant l'extinction de cette expression en transfectant au préalable dans nos cellules un siRNA spécifique. Ces expérimentations pourront être envisagées par la suite. La présence de ces récepteurs sur les hVICs suggère un rôle possible de l'IL-8 (et des autres ligands) sur ces cellules indépendamment de leur rôle déjà décrit dans les leucocytes et les cellules endothéliales [203][204][269][211].

Voies de signalisation intracellulaire

Nous nous sommes intéressés ensuite à explorer la voie de signalisation déclenchée après l'activation de ces récepteurs par l'IL-8. La liaison de l'IL-8 sur les récepteurs couplés aux protéines G, CXCR1 ou 2, peut activer plusieurs voies de signalisation comme la voie PI3K-Akt-P65, la voie MAP Kinase, la cascade de signalisation RAS-RAF-MEK-ERK [19] (**Figure15**). Nous avons commencé par analyser l'activation de la voie ERK en vérifiant la variation de l'expression des protéines ERK1/2 phosphorylées et totales par Western blot après stimulation des hVICs pendant 30 min en présence ou non d'IL-8. Les résultats n'ont pas montré d'effet de l'IL-8. À noter qu'une très grande variabilité du rapport P-ERK/ERK a été observée entre les conditions de traitement et entre les hVICs. Nous avons ensuite exploré

la voie NFκB. Normalement, NFκB forme un complexe avec IκB dans le cytoplasme, mais des stimuli externes peuvent déclencher la dissociation du complexe NFκB/IκB ce qui entraîne la translocation de NFκB dans le noyau de la cellule pour activer la transcription de certains gènes impliqués dans l'inflammation et la survie cellulaire. D'autre part, IκB est dégradé après ubiquitination dans le cytoplasme [270]. L'analyse de cette voie en Western blot a montré que son activation augmente par l'ajout d'IL-8 au Pi. Cette stimulation a été caractérisée par la phosphorylation de P-65 et la dégradation d'IκB et a été prévenue en bloquant pharmacologiquement CXCR1/2. D'après plusieurs études la voie NFκB est impliquée dans la calcification des hVICs [271][272][273]. De plus, NFκB est impliquée dans la synthèse et sécrétion des cytokines inflammatoires comme le TNF-α et l'IL-6 [274], suite à la translocation nucléaire de p65/p50 [275]. Ainsi, cette voie est parmi les voies les plus impliquées dans les pathologies impliquant une réaction inflammatoire, comme c'est le cas dans la calcification valvulaire [152]. Nos résultats se conforment avec ces données et montrent une activation dans les conditions procalcifiantes (3,8 mM de Pi) de la voie NFκB qui devient plus importante en présence d'IL-8. Cette activation semble impliquer l'activation de CXCR1/2 par l'IL-8 puisque l'effet de celle-ci est prévenu avec le SCH527123. Néanmoins, la démonstration aurait pu être complète en réalisant des immunofluorescences qui montrent la translocation nucléaire de P-65. De plus, bien que l'activation à 30 min soit très claire, une analyse de l'activation au cours du temps (0, 5, 10, 20, 30, 60 min par exemple) aurait fourni une idée plus précise de la cinétique d'activation et de désactivation de la voie. Par ailleurs, comme nous ne pouvons pas exclure que l'IL-8 ait pu déclencher l'activation d'autres voies de signalisation, des expérimentations supplémentaires seront nécessaire pour caractériser plus en détail les mécanismes de signalisation intracellulaire conduisant à l'effet amplificateur de l'IL-8 sur la calcification induite par le Pi. Il est toutefois important de noter que le lien entre NFκB et la calcification a déjà été décrit. En particulier, il a été montré que l'activation de NFκB favorise la calcification vasculaire induite par le Pi en inhibant en particulier la sécrétion de pyrophosphate ayant normalement un rôle d'inhibiteur de la calcification [276][277].

Effet de l'IL-8 sur la calcification des hVICs

Après avoir vérifié la présence des récepteurs et identifié une voie de signalisation impliquée dans la stimulation des hVICs par l'IL8, nous avons testé l'effet de l'ajout de concentrations croissantes d'IL-8 sur la calcification de ces cellules dans un milieu procalcifiant (Pi=3,8 mM). Nous avons trouvé que l'IL-8 induit une augmentation de la

calcification des cellules dès 5 pg/ml. Cette calcification a été plus élevée en augmentant la concentration à 15 pg/ml. En revanche, l'effet de l'IL-8 à la concentration de 50 pg/ml n'était pas significativement différent de celui obtenu à 15 pg/ml et tendait même à diminuer légèrement. Ce profil « en cloche » de la relation concentration-effet a été décrit avec les récepteurs couplés aux protéines G dont la voie de signalisation implique l'activation de la phospholipase C et la formation d'IP3 et DAG [278]. Il pourrait aussi être dû à un mécanisme de désensibilisation des récepteurs lorsque les récepteurs sont phosphorylés par des protéines kinases et ne réagissent plus aux stimuli extérieurs [19]. Par ailleurs, un mécanisme du type « agonisme biaisé » est également possible au-delà d'une certaine concentration d'IL-8 [279]. Il faut noter que l'effet de l'IL-8 à 15 pg/ml sur la calcification des hVICs est similaire à celui que nous avons observé précédemment à cette concentration avec les hASMCs [155]. En revanche, sur les hASMCs, la concentration de 50 pg/ml avait entraîné un effet significativement supérieur à celui mesuré à 15 pg/ml. Par conséquent, les hVICs et les hASMCs sont deux types cellulaires qui expriment CXCR1/2 et produisent d'avantage de calcifications lorsque de l'IL-8 est ajoutée au Pi, mais la réponse à l'IL-8 pourrait varier d'un type cellulaire à l'autre selon que la stimulation est faible ou élevée. Pour vérifier que l'effet de l'IL-8 sur la calcification des hVICs pourrait passer l'activation de CXCR1/2 et la stimulation de la voie NFκB, nous avons testé l'effet de l'ajout d'un antagoniste, le SCH527123, ou l'inhibiteur de la voie NFκB, JSH-23, sur la calcification. Le SCH527123, appelé également navarixine ou MK-7123 est un inhibiteur allostérique non compétitif puissant de CXCR1 et 2 avec une plus grande affinité pour CXCR2 par rapport à CXCR1. Cet agent pharmacologique a montré une certaine efficacité thérapeutique dans divers pathologies inflammatoires, en particulier la bronchopneumopathie chronique obstructive [280,281], mais n'a pas été évalué dans les maladies cardiovasculaires. Dans notre modèle *in vitro*, les hVICs exposées à 3,8 mM de Pi et 15 pg/ml d'IL-8 ont présenté significativement moins de calcification en présence de SCH527123 qu'en son absence. Ce résultat avait également été observé précédemment dans les hASMCs [155]. La prévention par le SCH527123 de l'effet amplificateur de l'IL-8 sur la calcification des hVICs était concentration-dépendante avec un effet préventif maximal observé à 2 μM. Ce résultat renforce notre observation précédente de la présence de CXCR1/2 dans les hVICs et suggère un rôle possible de ces récepteurs dans le mécanisme physiopathologique du RAC. Toutefois, malgré plusieurs essais de mise au point technique, nous ne sommes pas parvenus à inhiber l'expression séparément de CXCR1 et CXCR2 par siRNA, ce qui aurait permis de vérifier la spécificité de l'action de l'IL-8 et de comparer le rôle respectif de l'un et l'autre des

récepteurs dans l'effet observé. La poursuite de ces travaux sera nécessaire pour confirmer formellement la participation de CXCR1 et/ou CXCR2 dans les effets pro-calcifiants de l'IL-8. D'autre part, l'inhibiteur de la voie NFκB ou JSH-23 (4-méthyl-N1-(3-phényl-propyl)-benzène-1,2-diamine) est un inhibiteur de la translocation nucléaire de NFκB ayant un IC50 de 7,1μM [282]. L'inhibition de la voie NFκB par l'ajout de 15 μM de JSH-23 a réduit également la calcification. Ce résultat associé au résultat précédent suggère que l'effet de l'IL-8 sur la calcification des hVICs passe par l'activation de CXCR1/2 et que celle-ci stimule la voie NFκB.

Modulation transcriptomique des hVICs

Parmi les mécanismes évoqués dans la calcification des hVICs figure la différenciation ostéogénique qui implique l'expression de certaines protéines spécifiques de la matrice osseuse comme l'ostéocalcine, l'ostéopontine, les bone sialoprotéines, BMP-2/4, le collagène, ainsi que l'augmentation de certains facteurs de transcription comme le RunX2 [283][284][285][286]. Pour explorer le mécanisme induit par l'IL-8 en faveur de la calcification nous avons analysé en PCR l'expression à J3 de plusieurs marqueurs ostéogéniques (BMP2, Osx, ALP et OPN), myofibroblastiques (collagène 1-3, αSMA et élastine) et des métalloprotéases (MMP-2, -9 et -12) en présence ou non de 15 pg/ml d'IL-8 et en condition procalcifiante (Pi à 3,8 mM). En ajoutant l'IL-8 au Pi, les résultats ont montré une augmentation de l'expression de la métalloprotéase MMP12 et d'élastine et une diminution de celle d'ostéopontine par rapport au Pi seul. En revanche, l'expression des autres marqueurs n'a pas changé significativement. Il faut noter que l'effet de l'IL-8 sur l'expression de ces différents marqueurs a été également analysé à J7 avec des résultats similaires non significatifs. Le fait que l'IL-8 ne modifie pas l'expression de certains gènes connus pour être impliqués dans la différenciation ostéogénique des cellules indique que l'effet de l'IL-8 sur la calcification des hVICs ne passerait probablement pas par ce mécanisme de différenciation ostéogénique. En revanche, l'effet de l'IL-8 sur l'expression de MMP12, d'élastine et d'OPN suggère un effet de l'IL-8 sur le remodelage de la matrice extracellulaire qui pourrait faire le lit de la calcification.

Remodelage de la MEC in vitro

Le rôle de l'OPN dans la calcification est un sujet de débat et reste peu clair à ce jour. L'OPN est une protéine de la matrice extracellulaire jouant un rôle d'inhibiteur puissant de la calcification en inhibant la croissance des cristaux d'hydroxyapatite [287]. Il a été montré

que les valves [288–290] et les prothèses valvulaires calcifiées [291] expriment fortement l'OPN. Dans notre travail l'effet obtenu de l'IL-8 sur l'expression d'OPN par les hVICs est conforme au résultat observé précédemment dans les hASMCs [155]. Notre équipe avait d'ailleurs proposé l'hypothèse selon laquelle l'IL-8 exercerait son effet amplificateur de la calcification induite par le Pi en levant l'effet inhibiteur de l'ostéopontine dont l'expression est induite par le Pi. L'OPN est en effet un facteur ostéoblastique de contrôle de la minéralisation.

MMP12 possède une activité élastase (MMP12 est également appelée « macrophage élastase ») et est impliquée dans le remodelage de la MEC, en particulier au cours de certaines pathologies inflammatoires [292,293]. Une étude réalisée par *Perrota et al.* sur des valves humaines de patients atteints de sténose aortique valvulaire montre que la MMP12 se localise dans les zones les plus calcifiées des valves et qu'elle est associée à la désorganisation de la MEC [294]. En outre, l'expression de MMP12 est beaucoup plus importante dans les valves aortiques calcifiées en comparaison avec les valves normales [295][296]. Dans les valves calcifiées, il a été démontré que MMP12 induit l'expression de certains gènes tels que RUNX-2, BMP-2, ALP ce qui favorise la formation des dépôts calciques [296]. Dans une étude récente, la comparaison de valves récupérées chez des personnes après leur mort et qui ne présentaient pas cliniquement de sténose aortique avec celles des personnes mortes à cause de sténose aortique montre une perte de l'intégrité d'élastine et une augmentation de sa fragmentation avec d'autres anomalies de la MEC [297]. Par ailleurs, la dégradation de l'élastine par les élastases génère des peptides dérivés de l'élastine (PDE) appelés matrikines. Les matrikines augmentent la polarité des fibres élastiques, ce qui accroît leur affinité pour le calcium et forme ainsi un nid pour le dépôt et la croissance des cristaux. Elles ont de plus un rôle biologique propre, documenté essentiellement au niveau vasculaire, qui se manifeste par leur capacité à induire la transition ostéogénique des cellules musculaires lisses [142], et à promouvoir le recrutement des cellules inflammatoires [143], une caractéristique essentielle de la progression de la calcification valvulaire.

En se basant sur toutes ces données qui montrent que la dégradation d'élastine de la MEC par des métalloprotéases à activité élastase comme la MMP12 pourrait être impliquée dans la calcification de la valve aortique, nous avons fait l'hypothèse que l'IL-8, via l'activation de CXCR1/2 et la stimulation de la voie NFκB, induirait l'expression de la métalloprotéase MMP12 qui, par son activité élastase, pourrait dégrader l'élastine de la MEC

et favoriser ainsi la calcification des hVICs. Nous avons tout d'abord traité les hVICs avec un antagoniste des récepteurs de l'IL-8 et un inhibiteur de la voie NFκB afin d'analyser l'expression de MMP12 et d'élastine à J3, comme précédemment. Nous avons observé que l'effet de l'IL-8 sur l'expression de l'élastine et de la MMP12 est prévenu en bloquant CXCR1/2 ou en inhibant NFκB, indiquant que l'effet de l'IL-8 sur l'expression de ces deux protéines passe par l'activation de la voie NFκB déclenchée par la liaison d'IL-8 sur ses récepteurs. Pour confirmer que MMP12 est impliquée dans la calcification des hVICs, nous avons traité les hVICs avec un inhibiteur de la métalloprotéase MMP12. Cette inhibition de MMP12 a en effet réduit significativement l'effet de l'IL-8 sur la calcification. De plus, le « coating » préalable des boîtes de culture avec de l'élastine aortique humaine a augmenté l'effet de l'IL-8 sur la calcification des hVICs. La présence d'élastine en plus grande quantité (élastine préalablement introduite et élastine produite par les hVICs) pourrait conduire à une dégradation par conséquent plus importante sous l'effet de l'IL-8 et de la sécrétion de MMP12. De façon intéressante, l'analyse par Western blot a montré que l'ajout d'IL-8 au Pi a induit une augmentation de la dégradation d'élastine caractérisée par une diminution de la forme intacte à 65 KDa et une augmentation de la forme dégradée à 45KDa. Cette dégradation a de plus été prévenue en bloquant les récepteurs d'IL-8, la voie NFκB ou en inhibant la métalloprotéase MMP12. L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que le mécanisme de calcification des hVICs induit par l'IL-8 passerait par l'activation de CXCR1/2, la stimulation de la voie NFκB, la sécrétion de MMP12 et la dégradation subséquente de l'élastine extracellulaire. L'agent MMP-408 employé dans ce travail est un inhibiteur sélectif de l'activité enzymatique de MMP12 [298][299]. Or, comme déjà mentionné, MMP12 est une métalloprotéase à activité élastase. Il était donc attendu que son inhibition réduise la dégradation de l'élastine. En outre, des travaux précédents ont indiqué que MMP12 figure parmi les gènes potentiellement régulés par la voie NFκB. L'inhibition de la voie NFκB a inhibé la translocation nucléaire de P-65 et l'activation de l'expression de MMP12 [300,301], ce qui corrobore nos résultats. Dans notre modèle cellulaire, le blocage des récepteurs de l'IL-8 a induit une inhibition de l'activation de la voie NFκB ce qui a entraîné une inhibition de MMP12 et conduit finalement au même résultat, une diminution de la dégradation de l'élastine. Ainsi, le blocage de la signalisation induite par l'IL-8 en amont, c'est-à-dire au niveau de CXCR1/2, ou en aval au niveau de la voie NFκB ou même au niveau de l'activité de MMP12 aboutit au même effet de prévention de la dégradation d'élastine et de la calcification. En outre, l'effet a priori paradoxal de l'IL-8 sur l'augmentation de la synthèse d'élastine observée en PCR puis l'augmentation de sa

dégradation observée en Western blot pourrait être expliquée par le fait que la synthèse par la cellule serait une réponse à sa dégradation par les MMPs. Ce processus pourrait être lié notamment à la production des matrikines et permettrait d'expliquer en partie le cercle vicieux instauré par l'inflammation qui conduit à la progression du RAC [14]. D'autres travaux seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Remodelage de la MEC ex vivo

Pour donner une relevance clinique aux résultats précédents observés sur le modèle cellulaire ou tissulaire, nous avons travaillé sur des valves humaines de patients atteints de RAC et ayant subi un remplacement valvulaire chirurgical. L'immunomarquage confirme l'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 dans les valves aortiques humaines. En outre, en comparant les zones calcifiées (marquées par le rouge alizarine) et les zones non calcifiées de ces valves, nous avons constaté que l'expression de CXCR1, CXCR2 et de la métalloprotéase MMP12 est plus importante dans les zones calcifiées par rapport aux zones non calcifiées. Ces résultats ont été confirmés par Western blot où on a observé des bandes plus intenses de CXCR1, CXCR2 et de MMP12 en comparant les extraits protéiques des zones calcifiées par rapport aux zones non calcifiées. En outre le marquage de la forme intacte d'élastine est plus important dans les zones non calcifiées des valves et diminue dans les zones calcifiées, ce qui coïncide avec l'apparition d'une bande de plus faible poids moléculaire observée en Western blot, suggérant le clivage de l'élastine. La forte présence des récepteurs CXCR1 et CXCR2 dans les zones calcifiées des valves des patients atteints de RAC suggère leur association avec la pathologie. Toutefois, cette observation ne permet pas de relier le rôle de l'IL-8 au RAC puisque ces deux récepteurs peuvent être activés par une grande variété de cytokines inflammatoires. De plus, il n'est pas exclu que l'expression de CXCR1 et CXCR2 soit le reflet d'une infiltration leucocytaire dans la valve puisque les cellules inflammatoires (en particulier les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages) sont déjà connues pour exprimer également CXCR1 et CXCR2 et que l'inflammation est décrite comme un processus caractéristique de la maladie. Néanmoins, nos observations histologiques et en Western blot rapportent une expression importante de MMP12 qui coïncide avec celle de CXCR1 et CXCR2 dans les zones calcifiées des valves, lieu où l'on constate à l'inverse une moindre expression de la forme intacte d'élastine, et au contraire une augmentation de l'expression d'une forme dégradée de plus faible poids moléculaire. Malgré plusieurs essais de mises au point nous n'avons pas pu marquer l'élastine dégradée en immunohistologie que ce soit par marquage immunologique ou par

coloration de « Verhoeff Van Gieson » qui aurait pu objectiver la désorganisation des fibres d'élastine. Ces expérimentations seront envisagées pour la suite du travail. L'importance du travail sur ces valves récupérées des patients atteints de RAC est de renforcer la pertinence clinique de nos résultats obtenus *in vitro* en culture cellulaire. Toutefois, l'analyse de ces tissus reste uniquement observationnelle et seuls des liens d'associations (et pas de cause à effet) peuvent être proposés. Pour évaluer de façon expérimentale l'effet de l'IL-8 et le rôle de CXCR1/2, nous avons travaillé sur un modèle de valves de porc. En effet, ce modèle tissulaire offre l'avantage i) de disposer d'un tissu sain pour tester chaque condition de traitement, réduisant ainsi la variabilité interindividuelle importante lorsque l'on travaille sur des cellules primaires ou des tissus de patients, ii) de présenter des similitudes histologiques importantes avec les valves humaines [302], et iii) d'être facilement accessible en grande quantité à l'inverse des valves humaines. Ces valves de porc ont été coupées puis exposées aux différentes conditions de traitement étudiées dans le modèle cellulaire. De façon similaire, l'IL-8 a augmenté leur calcification en condition procalcifiante (Pi=3,8mM) et cet effet a été limité en ajoutant l'antagoniste des récepteurs de l'IL-8, l'inhibiteur de la voie NFkB ou l'inhibiteur de la métalloprotéase MMP12. En outre, l'immunomarquage des coupes montre que l'IL-8 induit une augmentation du marquage MMP12 qui diminue en bloquant CXCR1/2 ou la voie NFkB. Conformément aux résultats observés sur les hVICs, l'IL-8 peut induire l'expression de la métalloprotéase MMP12 via une voie impliquant CXCR1/2 et NFkB. Par ailleurs, le marquage de la forme intacte d'élastine semble avoir diminué en présence d'IL-8 puis réaugmenté en bloquant CXCR1/2, ou en inhibant NFkB ou MMP12. Ces résultats confirment ceux observés sur les hVICs et nous permettent de proposer un mécanisme physiopathologique de la calcification valvulaire aortique dépendant de l'IL-8, CXCR1/2, NFkB, MMP12 et l'élastine sans intervention obligatoire des leucocytes. En outre, ces résultats mettent en exergue de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement pharmacologique du RAC (**Figure 42**).

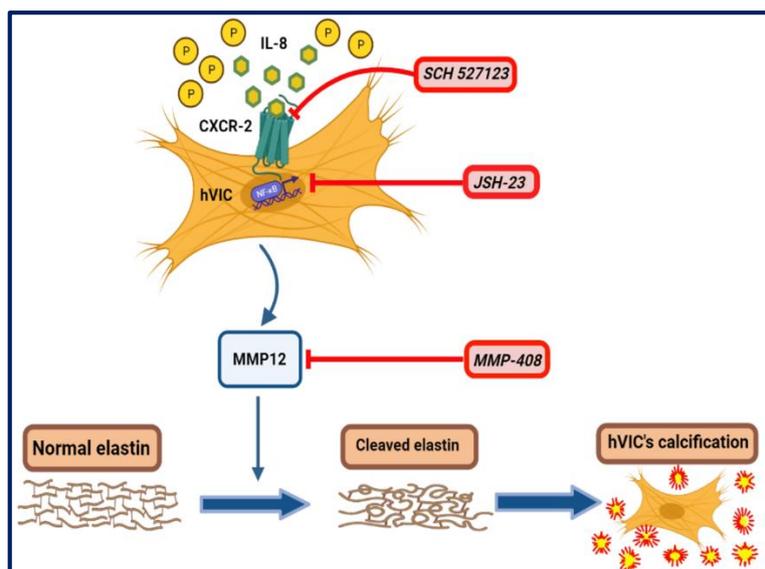


Figure 42 : Proposition de mécanisme induit par l'IL-8 en faveur de la calcification valvulaire aortique

Intérêt du blocage de CXCR1/2 dans un modèle de calcification valvulaire ectopique

Comme déjà mentionné, le RVA par voie chirurgicale utilisant des bioprothèses ou le TAVI sont les seules approches thérapeutiques actuelles du RAC. Généralement, ces bioprothèses sont fixées au GA avant leur implantation. Le problème des bioprothèses après implantation est leur calcification qui limite leur durée de vie [303]. Nous nous sommes intéressés à tester l'intérêt du blocage de CXCR1/2 dans un modèle de calcification valvulaire ectopique. Pour se faire, nous avons implanté en SC chez les rats des valves de porc préalablement incubées ou non avec le GA. Les rats ont été traités par SCH527123 administré par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale pendant 14j. Les résultats montrent que les valves préalablement fixées au GA présentent une calcification massive comparativement aux valves non fixées au GA et comparativement aux valves incubées avec du GA mais non implantées chez le rat. Ce résultat montre la réussite de notre modèle de calcification *in vivo* qui reproduit celui déjà réalisé par *Levy et al.* [261]. En effet, ce modèle d'implantation sous-cutanée chez le rat est utilisé depuis plusieurs décennies pour étudier la calcification des bioprothèses parce qu'il implique une procédure rapide, peu onéreuse et le tissu explanté présente une histopathologie similaire à celui observé dans les explants cliniques. L'implantation dorsale est préférable à l'abdominale car les sites d'implantation sont

beaucoup moins accessibles, ce qui limite les lésions de grattage des rats. De plus, il semblerait que les valves implantées en position dorsale se calcifient plus rapidement que celles implantées en position abdominale [304].

La calcification des bioprothèses serait causée par des mécanismes d'interaction chimique entre les groupes aldéhydes libres, les phospholipides et autres composants de la bioprothèse fixée au GA avec le calcium présent dans la circulation systémique [305]. Des études suggèrent que le système immunitaire serait également impliqué dans la calcification [306]. Dans notre modèle, le traitement des rats par SCH527123 en intrapéritonéal a prévenu significativement (de l'ordre de 50%) la calcification des valves ectopiques. Cette calcification a été réduite également avec le traitement local par voie sous-cutanée mais dans une moindre mesure. Dans le même temps, l'analyse sanguine a révélé une élévation du taux de leucocytes chez les rats recevant les valves fixées au GA par rapport aux rats recevant les valves non fixées et que cet effet est limité avec le SCH527123. Nous avons alors fait l'hypothèse que le blocage de CXCR1/2 réduit l'infiltration des cellules inflammatoires ce qui réduirait la réaction inflammatoire et la calcification. Par conséquent, nous avons réalisé des immunomarquages montrant une expression importante de cellules CD3+, CD11b+ et CD68+ dans les valves implantées fixées au GA par rapport aux valves implantées non fixées au GA et aux valves non implantées. De façon intéressante, l'immunomarquage des cellules semble diminuer dans les valves de rats traités par SCH527123 ; cette diminution est plus remarquable dans les valves des rats traités en intrapéritonéal en comparaison avec les valves des rats traités par voie sous-cutanée. Ces résultats suggèrent que la calcification des valves serait associée à une infiltration des cellules inflammatoires diminuant avec le blocage des récepteurs d'IL-8. Cependant, d'autres travaux seront nécessaires pour confirmer ces observations. De plus, l'association ne permet pas de conclure sur un éventuel lien de causalité. Par ailleurs, le mécanisme par lequel cette infiltration leucocytaire conduirait à la calcification reste à élucider. Certains processus consécutifs de la réaction inflammatoire peuvent se dérouler au niveau de la valve (comme la dégradation d'élastine par les MMPs impliquée dans la dégradation de la valve native), favorisant la progression de la calcification de manière similaire aux mécanismes impliqués dans la physiopathologie du RAC. Malgré plusieurs essais de mis en point, nous n'avons pas pu extraire des quantités suffisantes de protéines pour faire les analyses en Western blot. En effet le GA change la structure de la valve et la rigidifie ce qui la rend moins accessible à la manipulation et à l'extraction des protéines. Ces expérimentations nécessitent des protocoles spécifiques au GA ; des

expérimentations supplémentaires seront envisagées pour la suite du travail afin d'explorer les mécanismes impliqués dans la calcification des bioprothèses et le lien entre inflammation et calcification dans ce modèle.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le rétrécissement aortique calcifié (RAC) est une pathologie cardiaque grave dont l'incidence augmente avec l'âge et du fait du vieillissement de la population. À ce jour il n'existe pas un traitement pharmacologique validé pour traiter les patients atteints du RAC. Le seul traitement proposé est le RVA par voie chirurgical ou TAVI qui sont des interventions lourdes et coûteuses. L'inflammation joue un rôle critique dans l'initiation et la progression de la calcification valvulaire. L'IL-8, une cytokine inflammatoire dont le rôle a déjà été montré par notre laboratoire dans la calcification vasculaire, pourrait également être impliquée dans la calcification valvulaire.

Dans ce travail nous avons étudié le rôle d'IL-8 dans la calcification valvulaire et nous avons testé l'effet du blocage pharmacologique des récepteurs CXCR1/2 sur cette calcification. Nous avons isolé des hVICs à partir des valves des patients atteints du RAC et ayant subi un RVA par voie chirurgicale, puis nous avons vérifié en premier qu'ils expriment les récepteurs d'IL-8 CXCR1/2. Ensuite nous avons testé l'effet d'IL-8 sur la calcification et nous avons trouvé que l'IL-8 augmente la calcification des hVICs et que cet effet a été prévenu en bloquant pharmacologiquement CXCR1/2. D'après nos résultats, la calcification des hVICs serait associée à un mécanisme de dégradation d'élastine qui implique l'activation de la voie de signalisation NFκB et la métalloprotéase MMP12. En outre le blocage pharmacologique des récepteurs d'IL-8, de la voie NFκB ou l'inhibition de MMP12 a réduit la calcification. La comparaison des zones calcifiées et non calcifiées des valves récupérées des patients atteints du RAC montre une surexpression de CXCR1, CXCR2, MMP12 et une dégradation d'élastine dans les zones calcifiées des valves. Ces résultats ont permis de renforcer la pertinence clinique de nos résultats observés sur les hVICs *in vitro*. Par ailleurs, nous avons travaillé sur des valves de porcs saines afin de reproduire le modèle cellulaire des hVICs sur un modèle tissulaire plus complexe. Les résultats obtenus ont confirmé ceux du modèle cellulaire et ont montré également que l'IL-8 favorise la calcification des valves aortiques ; cet effet a été prévenu également en bloquant CXCR1/2, la voie NFκB ou MMP12. Enfin, nous nous sommes intéressés à tester l'effet du blocage pharmacologique de CXCR1/2 dans un modèle animal de calcification valvulaire ectopique. Ce modèle a consisté à implanter au niveau dorsal chez le rat, par voie sous-cutanée, des feuillets valvulaires aortiques de porc préalablement exposés au GA puis à évaluer la calcification de ces tissus après 14 jours. Les résultats ont montré un effet préventif de l'administration chez le rat de SCH527123 par voie intrapéritonéale sur la calcification de la valve implantée. Cet effet était associé à une moindre expression au niveau des valves implantées des marqueurs CD3, CD11

et CD68, suggérant une réduction de l'infiltration leucocytaire. Finalement, notre travail a montré un rôle important de l'IL-8 dans la calcification valvulaire aortique et a identifié de nouvelles cibles thérapeutiques telles que CXCR1/2, NFkB et MMP12. L'IL-8 pourrait exercer son effet procalcifiant de façon directe sur les hVICs dans les valves natives mais également de façon indirecte via son effet sur le chimiotactisme des leucocytes, notamment dans les bioprothèses valvulaires. D'après les différents modèles étudiés dans notre travail, le blocage des récepteurs d'IL-8 permettrait de réduire la calcification des valves aortiques natives chez les patients atteints du RAC mais également de réduire la calcification des bioprothèses valvulaires. D'autres travaux devront être menés pour d'une part confirmer le rôle mécanistique des différents acteurs mis en évidence ici grâce par exemple à des modèles génétiquement modifiés, et d'autre part pour tester l'effet des antagonistes de CXCR1/2 dans des modèles physiopathologiques plus proches du RAC ou de la dégénérescence de bioprothèse chez l'homme.

VALORISATION DU TRAVAIL

Communications orales

- Congrès de la SFC (Société Française de Cardiologie), Janvier 2022, Paris, France.
Abstract: **Dhayni K**, Chabry Y, Hénaut L, Ouled-Haddou H, Avondo C, Tribouilloy C, Caus T, Zibara K, Kamel S, Bennis Y. IL-8 promotes the calcification of human aortic valve interstitial cells, which is prevented through antagonizing CXCR1 and CXCR2 receptors. Arch Cardiovasc Dis Suppl. 2022; 14(1):101. <https://10.1016/j.acvdsp.2021.09.233>.
- Congrès de la SFBTM (Société Française de Biologie des Tissus Minéralisés), Avril 2022, La Baule-Escoublac, France.

Communications affichées avec enregistrement oral (poster digital commenté)

- Congrès de l'ESC (European Society of Cardiology), Août 2021 (congrès virtuel)
Abstract: **Dhayni K**, Chabry Y, Henaut L, Ouled-Haddou H, Avondo C, Tribouilloy C, Caus T, Zibara K, Kamel S, Bennis Y. IL-8 promotes the calcification of human aortic valve interstitial cells, which is prevented through antagonizing CXCR1 and CXCR2 receptors. Eur Heart J. 2021; 42(Supplement_1): ehab724.3333. <https://10.1093/eurheartj/ehab724.3333>

Communications affichées

- Congrès de la SFC (Société Française de Cardiologie), Janvier 2022, Paris, France.
Abstract: Chabry Y, **Dhayni K**, Lanoix JP, Boyer T, Vasse S, Epailly J, Nader J, Kamel S, Caus T, Bennis Y. Prevention of the calcification of porcine heart valve leaflets implanted subcutaneously in rats by an interleukin-8 receptors antagonist (SCH527123). Arch Cardiovasc Dis Suppl. 2022;14(1):123. <https://10.1016/j.acvdsp.2021.09.276>.

Articles

- Article 1: **Dhayni K**, Zibara K, Issa H, Kamel S, Bennis Y. Targeting CXCR1 and CXCR2 receptors in cardiovascular diseases. Revue de la littérature publiée dans le journal *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108257>.
- Article 2: **Dhayni K**, Chabry Y, Hénaut L, Ouled-Haddou H, Avondo A, Boudot C, Tribouilloy C, Touati G, Caus T, Messaoudi H, Bellien J, Messika-Zeitoun D, Zibara K, Kamel S, Bennis Y. Aortic valve calcification is promoted by interleukin-8 and can be restricted through antagonizing cxcr2. Article original en cours de soumission.
- Article 3: Chabry Y, **Dhayni K**, Lanoix JP, Boyer T, Vasse S, Epailly J, Nader J, Kamel S, Caus T, Bennis Y. Prevention of the calcification of porcine heart valve leaflets implanted subcutaneously in rats by an interleukin-8 receptors antagonist (SCH527123). Article original en cours de soumission.

IL-8 promotes the calcification of human aortic valve interstitial cells, which is prevented through antagonizing CXCR1 and CXCR2 receptors

K. Dhayni¹, Y. Chabry², L. Henaut¹, H. Ouled-Haddou³, C. Avondo¹, C. Tribouilloy⁴, T. Caus², K. Zbara⁵, S. Kamel¹, Y. Bennis¹

¹UPJV Amiens, MP3CV Laboratory, UPJV UR 7517, Amiens, France; ²University Hospital of Amiens, Department of cardiac surgery, Amiens, France; ³UPJV Amiens, HEMATIM Laboratory, UPJV UR 4666, Amiens, France; ⁴University Hospital of Amiens, Department of Cardiology, Amiens, France; ⁵Lebanese University, Department of Biology, Faculty of Sciences, Beirut, Lebanon

Funding Acknowledgement: Type of funding sources: Public Institution(s). Main funding source(s): Fédération Hospitalo-Universitaire REMOD-VHF

Background/Introduction: Inflammation is a key feature of calcific aortic valve stenosis (CAVS) against which there is currently no pharmacological treatment.

Purpose: To verify the hypothesis that interleukin-8 (IL-8), a pro-inflammatory factor involved in arterial calcifications, also promotes the calcification of human aortic valve interstitial cells (hVICs).

Methods: Primary hVICs were isolated from healthy pieces of aortic valves harvested from patients undergoing surgical valve replacement. They were cultured in a pro-calcifying condition (Pi-3.8mM) with or without IL-8 (5 to 50 pg/ml) for up to 21 days. Calcification was analysed by alizarin red staining and calcium content was measured with the o-cresolphthalein complexone method. The viability of hVICs was verified by the MTT assay. The expression of osteogenic (BMP2, OPN, osterix and ALP) and myofibrotic (alpha-SMA, collagen-1, collagen-3 and elastin) markers as well as that of metalloproteases (MMP-2, -9 and -12) was analysed by RT-qPCR. The expression of IL-8 receptors, CXCR-1 and CXCR-2 was evaluated by Western blot and flow cytometry, and the effects of IL-8 were tested in the presence or absence of SCH527123, an antagonist of CXCR-1 and CXCR-2. Finally, the expression of CXCR-1 and -2 and elastin was analysed by immunohis-

tochemistry in the calcified and non-calcified areas of human aortic valve samples. All of these experiments were carried out from valves of at least 5 different donors and a P<0.05 was considered statistically significant.

Results: IL-8 (15 pg/mL) caused a significant ~2-fold increase in the calcification of hVICs in the Pi condition, compared to the Pi-only condition, without modulation of cell viability. In the presence of Pi, IL-8 exposure significantly stimulated the expression of the transcripts of elastin and MMP-12, an elastase, and reduced that of OPN, a well-known inhibitor of calcification. The effects of IL-8 on hVICs calcification and on the expression of MMP-12, elastin and OPN transcripts were significantly prevented by the addition of SCH527123. In addition, the expression of CXCR-1 and -2 was confirmed in histological samples of human aortic valves. This expression was more pronounced in calcified areas compared to non-calcified areas and co-localized with degraded elastin.

Conclusion: IL-8 promoted the calcification of hVICs in culture. This effect was significantly prevented by antagonizing CXCR-1 and CXCR-2 IL-8 receptors, which we showed for the first time to be expressed by human VICs and aortic valves of patients with CAVS. Further studies are underway to clarify the cellular mechanisms involved.

086

Assessment of the PPG up-stroke time to predict peripheral lower limb arterial occlusive disease (PAOD): Application to the pOpmetre®



H. Obeid^{1,*}, K. Eveilleau², M. Hallab³, I. Abi-Nasr³, G. Leftheriotis²

¹ Unité de Pharmacologie-PARCC-Inserm U970, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

² Centre universitaire hospitalier de Nice, Unité de Médecine et Chirurgie Vasculaire, Nice, France

³ Clinique Bizet, Paris, France

* Corresponding author.

E-mail address: hasan.obeid90@gmail.com (H. Obeid)

Objective Screening for peripheral lower limb arterial occlusive disease (PAOD) is a major challenge for the prevention, management and treatment of patients with arteriosclerosis. The Ankle Brachial Index (ABI) is the reference method, it requires expertise and time which are limiting factors for systematic screening. The analysis of a photoplethysmographic (PPG) wave form in the lower limb can be an interesting alternative.

Design and method In a retrospective pilot study we analyzed the possibility of detecting PAOD by measuring the up-stroke time wave form (UTP) at the toe by PPG method. The ABI (minimum of 2 leg arteries) and the UTP (pOpmetre® - Axelif - France) were collected in 54 patients during a vascular assessment and presenting different stages of PAOD.

Results Of the 108 lower limbs registered, 25 were excluded for technical difficulties (very severe PAOD, medial calcosis, toe amputation). 83 lower limbs were analyzed. Mean age was 69 ± 12 ; 75% men, 28% diabetics, 47% hypertensive. 17% without PAOD (stage 0); 44% stage 1; 23% stage 2; and 2% Stage 3. The 200 milliseconds UTP threshold identifies PAOD from stage 1 with: sensitivity 77%, specificity 94%, a positive predictive value 96% and negative predictive value 68% (Yule Q = 0.96). UTP makes it possible to identify an PAOD in 100% of patients with medial calcosis (ABPI > 1.4, n = 3, diabetic = 2).

Conclusions The UTP measured by PPG at the toe is a simple and rapid method (<2 min) detects the PAOD stages 1 to 3 with 94% specificity, 77% sensitivity that must be improved by using other thresholds to optimize the test. These results have to be confirmed with a prospective study.

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

<https://doi.org/10.1016/j.acvdsp.2021.09.233>

201

IL-8 promotes the calcification of human aortic valve interstitial cells, which is prevented through antagonizing CXCR1 and CXCR2 receptors



K. Dhayni^{1,*}, Y. Chabry^{1,2}, L. Hénaut¹, H. Ouled-Haddou³, C. Avondo¹, C. Tribouilloy^{1,4}, T. Caus^{1,2}, K. Zibara⁵, S. Kamel¹, Y. Bennis^{1,6}

¹ MP3CV Laboratory, UPJV UR 7517, Amiens, France

² Department of Cardiac Surgery, CHU Amiens-Picardie, Amiens, France

³ HEMATIM laboratory, UPJV UR 4666, Amiens, France

⁴ Department of Cardiology, CHU Amiens-Picardie, Amiens, France

⁵ Department of Biology, Faculty of Sciences, Lebanese University, Beirut, Liban

⁶ Department of Pharmacology, CHU Amiens-Picardie, Amiens, France

* Corresponding author.

E-mail address: kawthardhayni43@hotmail.com (K. Dhayni)

Inflammation is a key feature of calcific aortic valve stenosis (CAVS) with no pharmacological treatment until now. We hypothesize that interleukin-8 (IL-8) promotes the calcification of human aortic valve interstitial cells (hVICs). Primary hVICs were isolated from healthy pieces of aortic valves harvested from patients undergoing surgical valve replacement. They were cultured in a pro-calcifying condition (PI-3.8 mM) with or without IL-8 (5 to 50 pg/ml) for up to 21 days. Calcification was analysed by alizarin red staining and calcium content was measured with the o-cresolphthalein complexone method. The expression of each of metalloproteases, osteogenic and myofibrotic markers was analysed by RT-qPCR. The expression of IL-8 receptors, CXCR-1 and CXCR-2 was evaluated by Western blot and flow cytometry, and the effects of IL-8 were tested in the presence or absence of SCH527123, an antagonist of CXCR-1 and CXCR-2. Finally, the expression of CXCR-1 and -2 and that of elastin were analysed by immunohistochemistry in the calcified and non-calcified areas of human aortic valve samples. All of these experiments were carried out from valves of at least 5 different donors where a P-value < 0.05 was considered statistically significant. Our results showed that IL-8 (15 pg/mL) caused a significant ~2-fold increase in the calcification of hVICs in the PI condition. In the same condition, IL-8 stimulated the expression of elastin and MMP-12 but reduced that of OPN. These effects of IL-8 were prevented by the addition of SCH527123. In addition, the expression of CXCR-1 and -2 was confirmed in histological samples of human aortic valves. This expression was more pronounced in calcified areas compared to non-calcified areas and co-localized with degraded elastin. We concluded that IL-8 promoted the calcification of hVICs. This effect was prevented by antagonizing CXCR-1 and CXCR-2, which we showed to be expressed by human VICs and aortic valves of patients with CAVS.

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

<https://doi.org/10.1016/j.acvdsp.2021.09.233>

analysed. Pulmonary autograft was reimplanted in a Dacron conduit of a median diameter = 26 mm (range: 20–30) using Tirone David's technique of valve sparing aortic root replacement (VSR). Median age was 17 years (range: 6–38). Majority of cases has presented with mono or bicuspid aortic valve ($n=50$; 85%), predominant aortic valve regurgitation ($n=38$; 64%) and dilatation (>30 mm) of the ascending aorta ($n=32$; 54%). Forty-six (78%) had at least one prior aortic valve procedure.

Results No death occurred. Three patients required early procedure-related reoperation 8 others were reoperated on later resulting in 3 neo-aortic valve replacement all-over (5%). The mean duration of follow-up was 46 ± 12 months. Neither more than mild autograft regurgitation nor stenosis was observed. Mean diameters of the autograft annulus and sinotubular junction were respectively 24.8 ± 2.6 mm and 25.3 ± 2.1 mm at discharge and 25.3 ± 2.1 mm and 25.4 ± 2.7 mm at the last visit ($P=0.06$ and 0.08).

Conclusion Autograft reinforcement by means of reimplantation technique prevented neo-aortic root dilatation and allowed to extend the indications for Ross procedure to patients for whom the conventional Ross technique was qualified to be unsuitable. Early failure was rare (5%) and mid-term outcomes confirmed the stability of the neo-aortic valve function in follow-up.

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

<https://doi.org/10.1016/j.acvdsp.2021.09.275>

397 Prevention of the calcification of porcine heart valve leaflets implanted subcutaneously in rats by an interleukin-8 receptors antagonist (SCH527123)

Y. Chabry^{1,*}, K. Dhayni², J.P. Lanolix³, T. Boyer⁴, S. Vasse^{1,2}, J. Epailly², J. Nader^{1,2}, S. Kamel², T. Caus^{1,2}, Y. Bennis^{2,5}

¹ Chirurgie cardiaque, CHU Amiens-Picardie, Amiens, France

² MP3CV laboratory, UPJV UR 7517, Amiens, France

³ AGIR laboratory, UPJV UR 4294, Amiens, France

⁴ HEMATIM laboratory, UPJV UR 4666, Amiens, France

⁵ Department of pharmacology, CHU Amiens-Picardie, Amiens, France

* Corresponding author.

E-mail address: yuthiline@gmail.com (Y. Chabry)

Bioprosthetic heart valve calcification may result from interactions between the host's immune system and the glutaraldehyde (GA)-fixed tissue that makes up the leaflets. We hypothesized that antagonizing interleukin-8 (IL-8) receptors, CXCR-1 and CXCR-2, may prevent the calcification of GA-fixed porcine aortic valves implanted subcutaneously in rats.

Three-week-old Sprague Dawley males were transplanted with 2 aortic valve leaflets isolated from pigs and implanted into the dorsal wall. Four groups of 3–4 rats (6–8 independent leaflets each time) were compared: glutaraldehyde (GA)-free leaflets, GA-fixed leaflets (0.6% GA for 24 h before implantation), GA-fixed leaflets and treatment of rats with 1 mg/kg SCH527123 (a CXCR1/2 antagonist) injected once a day locally subcutaneously (SC) or intraperitoneally (IP). Fourteen days later, rats underwent blood leukocyte count and CT-scan, before porcine leaflets explantation and histology and biochemistry analyses.

As expected, strong calcification of ectopic valves was induced by the GA. However, we observed a significant about 40% decrease in this effect when rats were treated with the SCH527123. These effects were confirmed by CT-scan acquisitions and Alizarin red staining of valves. Besides, GA pre-incubation of valves significantly increased leukocytes count in rat blood, an effect that is significantly prevented by IP SCH527123 (6.9, 16.6 and $6.8 \times 10^9/L$ in the GA-free, GA and GA + IP SCH527123 groups respectively, $P=0.0129$). Immunohistochemistry of ectopic valves highlighted higher infiltra-

tion of CD3 (lymphocytes) and CD68 (macrophages) cells in the GA group compared to the GA-free and GA + SCH527123 groups. Therefore, the calcification of GA-fixed porcine aortic valve leaflets, implanted subcutaneously in rats, is significantly prevented by antagonizing IL-8 receptors with SCH527123. This effect might partly result from an inhibition of the GA-induced leukocytes activation and recruitment into the graft tissue.

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

<https://doi.org/10.1016/j.acvdsp.2021.09.276>

210 Correlation between microvascular inflammation in endomyocardial biopsies and rejection transcripts, donor-specific antibodies and graft dysfunction in antibody-mediated rejection

G. Coutance^{1,*}, I. Zouhry², A. Loupy², P. Bruneval², J.P. Duong Van Huyen²

¹ Chirurgie cardiaque, Institut de cardiologie, Pitié-Salpêtrière, Paris, France

² Paris transplant group, Paris, France

* Corresponding author.

E-mail address: guillaume.coutance@gmail.com (G. Coutance)

Background The pathology-based diagnosis of antibody-mediated rejection (AMR) following heart transplantation relies on the 2013 Working Formulation in which microvascular inflammation (MVI) is considered as present or absent regardless of its extent. This work assessed the biological and clinical value of a semiquantitative evaluation of the extent of MVI in endomyocardial biopsies (EMB).

Methods We retrospectively graded the extent of MVI in 291 EMB from 291 patients according to a 4-point scale where MVI scores of 0, 1, 2 and 3 represented 0%, 1–10%, 11–50% and > 50% of the myocardial area, respectively. We analyzed the association between the MVI score and tissue rejection molecular activity assessed by micro-

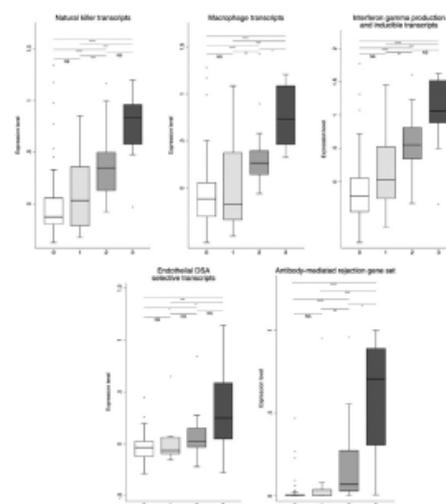


Fig. 1 Correlation of the microvascular inflammation (MVI) score with molecular profiles as assessed by microarray analysis.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] H. Baumgartner, J. Hung, J. Bermejo, J.B. Chambers, T. Edvardsen, S. Goldstein, P. Lancellotti, M. LeFevre, F. Miller, C.M. Otto, Recommendations on the Echocardiographic Assessment of Aortic Valve Stenosis: A Focused Update from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography, *J Am Soc Echocardiogr.* 30 (2017) 372–392. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2017.02.009>.
- [2] N.M. Rajamannan, F.J. Evans, E. Aikawa, K.J. Grande-Allen, L.L. Demer, D.D. Heistad, C.A. Simmons, K.S. Masters, P. Mathieu, K.D. O'Brien, F.J. Schoen, D.A. Towler, A.P. Yoganathan, C.M. Otto, Calcific Aortic Valve Disease: Not Simply a Degenerative Process: A Review and Agenda for Research From the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group *Executive Summary: Calcific Aortic Valve Disease – 2011 Update*, *Circulation.* 124 (2011) 1783–1791. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.006767>.
- [3] R.C. Russo, C.C. Garcia, M.M. Teixeira, F.A. Amaral, The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases, *Expert Rev Clin Immunol.* 10 (2014) 593–619. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.894886>.
- [4] F.E.C.M. Peeters, S.J.R. Meex, M.R. Dweck, E. Aikawa, H.J.G.M. Crijns, L.J. Schurgers, B.L.J.H. Kietzelaer, Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart, *European Heart Journal.* 39 (2018) 2618–2624. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx653>.
- [5] M.T. Boskovski, T.G. Gleason, Current Therapeutic Options in Aortic Stenosis, *Circ Res.* 128 (2021) 1398–1417. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318040>.
- [6] I.J. Amat-Santos, S. Santos-Martínez, T. Rodríguez-Gabella, J. López, A. San Román, Reply: TAVR in Healed Endocarditis: A Picture May Be Worth 1,000 Words, *JACC Cardiovasc Interv.* 13 (2020) 2710–2711. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2020.10.010>.
- [7] O. Varennes, I. Six, R. Mentaverri, S. Kamel, Mécanismes physiopathologiques du rétrécissement aortique calcifié, *Revue Francophone des Laboratoires.* 2017 (2017) 25–32. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(17\)30236-8](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(17)30236-8).
- [8] A.C. Liu, V.R. Joag, A.I. Gotlieb, The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology, *The American Journal of Pathology.* 171 (2007) 1407–1418. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070251>.
- [9] T.A. Pawade, D.E. Newby, M.R. Dweck, Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key, *J Am Coll Cardiol.* 66 (2015) 561–577. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.05.066>.
- [10] A. Bakhshian Nik, J.D. Hutcherson, E. Aikawa, Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification, *Front. Cardiovasc. Med.* 4 (2017) 78. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00078>.
- [11] N. Kochtebane, C. Choqueux, J.-B. Michel, M.-P. Jacob, Remodelage de la matrice extracellulaire dans les valves atteintes de sténose aortique, *Biologie Aujourd'hui.* 206 (2012) 135–143. <https://doi.org/10.1051/jbio/2012015>.
- [12] A.J. Scott, L.R. Simon, H.N. Hutson, A.M. Porras, K.S. Masters, Engineering the aortic valve extracellular matrix through stages of development, aging, and disease, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 161 (2021) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.07.009>.

- [13] L. Duca, S. Blaise, B. Romier, M. Laffargue, S. Gayral, H. El Btaouri, C. Kawecki, A. Guillot, L. Martiny, L. Debelle, P. Maurice, Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation, *Cardiovasc Res.* 110 (2016) 298–308. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw061>.
- [14] P. Maurice, S. Blaise, S. Gayral, L. Debelle, M. Laffargue, W. Hornebeck, L. Duca, Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: the elastokine concept, *Trends Cardiovasc Med.* 23 (2013) 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.12.004>.
- [15] M.R. Dweck, N.A. Boon, D.E. Newby, Calcific Aortic Stenosis, *Journal of the American College of Cardiology.* 60 (2012) 1854–1863. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.02.093>.
- [16] M. Olsson, J. Thyberg, J. Nilsson, Presence of Oxidized Low Density Lipoprotein in Nonrheumatic Stenotic Aortic Valves, *ATVB.* 19 (1999) 1218–1222. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.5.1218>.
- [17] Q. Zhan, R. Song, Q. Zeng, Q. Yao, L. Ao, D. Xu, D.A. Fullerton, X. Meng, Activation of TLR3 Induces Osteogenic Responses in Human Aortic Valve Interstitial Cells through the NF- κ B and ERK1/2 Pathways, *Int. J. Biol. Sci.* 11 (2015) 482–493. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10905>.
- [18] S.E.P. New, E. Aikawa, Molecular Imaging Insights Into Early Inflammatory Stages of Arterial and Aortic Valve Calcification, *Circ Res.* 108 (2011) 1381–1391. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.234146>.
- [19] H. Ha, B. Debnath, N. Neamati, Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases, *Theranostics.* 7 (2017) 1543–1588. <https://doi.org/10.7150/thno.15625>.
- [20] H.Y. Kim, Y.J. Kang, I.H. Song, H.C. Choi, H.S. Kim, Upregulation of interleukin-8/CXCL8 in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats, *Hypertens Res.* 31 (2008) 515–523. <https://doi.org/10.1291/hypres.31.515>.
- [21] M. Liu, M. Luo, H. Sun, B. Ni, Y. Shao, Integrated Bioinformatics Analysis Predicts the Key Genes Involved in Aortic Valve Calcification: From Hemodynamic Changes to Extracellular Remodeling, *Tohoku J Exp Med.* 243 (2017) 263–273. <https://doi.org/10.1620/tjem.243.263>.
- [22] W. Zhang, J.-G. Wang, Prevention of Atrial Fibrillation by Intensive Antihypertensive Treatment, *Hypertension.* 75 (2020) 1414–1416. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14856>.
- [23] E. Aikawa, F.J. Schoen, Calcific and Degenerative Heart Valve Disease, in: *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease*, Elsevier, 2014: pp. 161–180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405206-2.00009-0>.
- [24] S.F. Badylak, Regenerative medicine approach to heart valve replacement, *Circulation.* 111 (2005) 2715–2716. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.542837>.
- [25] W.S. Kerstjens-Frederikse, I.M.B.H. van de Laar, Y.J. Vos, J.M.A. Verhagen, R.M.F. Berger, K.D. Lichtenbelt, J.S. Klein Wassink-Ruiter, P.A. van der Zwaag, G.J. du Marchie Sarvaas, K.A. Bergman, C.M. Bilardo, J.W. Roos-Hesselink, J.H.P. Janssen, I.M. Frohn-Mulder, K.Y. van Spaendonck-Zwarts, J.P. van Melle, R.M.W. Hofstra, M.W. Wessels, Cardiovascular malformations caused by NOTCH1 mutations do not keep left: data on 428 probands with left-sided CHD and their families, *Genet Med.* 18 (2016) 914–923. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.193>.

- [26] B.F. Stewart, D. Siscovick, B.K. Lind, J.M. Gardin, J.S. Gottdiener, V.E. Smith, D.W. Kitzman, C.M. Otto, Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *Cardiovascular Health Study, J Am Coll Cardiol.* 29 (1997) 630–634. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(96\)00563-3](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(96)00563-3).
- [27] G.J. Morgan-Hughes, C.A. Roobottom, Aortic valve calcification on computed tomography predicts the severity of aortic stenosis, *Clin Radiol.* 59 (2004) 208; author reply 208-209. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2003.10.012>.
- [28] J.J. Kaden, S. Freyer, G. Weisser, W. Willingstorfer, A. Bilbal, S. Pflieger, T. Süsselbeck, K.K. Haase, C.-E. Dempfle, M. Borggrefe, Correlation of degree of aortic valve stenosis by Doppler echocardiogram to quantity of calcium in the valve by electron beam tomography, *The American Journal of Cardiology.* 90 (2002) 554–557. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02537-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02537-7).
- [29] J. Boulif, B. Gerber, A. Slimani, S. Lazam, C. de Meester, S. Piérard, A. Pasquet, A.-C. Pouleur, D. Vancaeynest, G. El Khoury, L. de Kerchove, P. Noirhomme, J.-L. Vanoverschelde, Assessment of aortic valve calcium load by multidetector computed tomography. Anatomical validation, impact of scanner settings and incremental diagnostic value, *Journal of Cardiovascular Computed Tomography.* 11 (2017) 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.jcct.2017.07.004>.
- [30] F. Sturla, M. Ronzoni, M. Vitali, A. Dimasi, R. Vismara, G. Preston-Maher, G. Burriesci, E. Votta, A. Redaelli, Impact of different aortic valve calcification patterns on the outcome of transcatheter aortic valve implantation: A finite element study, *J Biomech.* 49 (2016) 2520–2530. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2016.03.036>.
- [31] A. Abdelbaky, E. Corsini, A.L. Figueroa, S. Subramanian, S. Fontanez, H. Emami, U. Hoffmann, J. Narula, A. Tawakol, Early aortic valve inflammation precedes calcification: a longitudinal FDG-PET/CT study, *Atherosclerosis.* 238 (2015) 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.11.026>.
- [32] F.D. Grant, F.H. Fahey, A.B. Packard, R.T. Davis, A. Alavi, S.T. Treves, Skeletal PET with 18F-fluoride: applying new technology to an old tracer, *J Nucl Med.* 49 (2008) 68–78. <https://doi.org/10.2967/jnumed.106.037200>.
- [33] A. Irkle, A.T. Vesey, D.Y. Lewis, J.N. Skepper, J.L.E. Bird, M.R. Dweck, F.R. Joshi, F.A. Gallagher, E.A. Warburton, M.R. Bennett, K.M. Brindle, D.E. Newby, J.H. Rudd, A.P. Davenport, Identifying active vascular microcalcification by (18)F-sodium fluoride positron emission tomography, *Nat Commun.* 6 (2015) 7495. <https://doi.org/10.1038/ncomms8495>.
- [34] M.R. Dweck, W.S.A. Jenkins, A.T. Vesey, M.A.H. Pringle, C.W.L. Chin, T.S. Malley, W.J.A. Cowie, V. Tsampasian, H. Richardson, A. Fletcher, W.A. Wallace, R. Pessotto, E.J.R. van Beek, N.A. Boon, J.H.F. Rudd, D.E. Newby, 18F-sodium fluoride uptake is a marker of active calcification and disease progression in patients with aortic stenosis, *Circ Cardiovasc Imaging.* 7 (2014) 371–378. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.113.001508>.
- [35] A. Agusti, D.D. Sin, Biomarkers in COPD, *Clin Chest Med.* 35 (2014) 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2013.09.006>.
- [36] L. Calzetta, A. Orlandi, C. Page, P. Rogliani, B. Rinaldi, G. Rosano, M. Cazzola, M.G. Matera, Brain natriuretic peptide: Much more than a biomarker, *Int J Cardiol.* 221 (2016) 1031–1038. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.07.109>.
- [37] J. Bergler-Klein, U. Klar, M. Heger, R. Rosenhek, G. Mundigler, H. Gabriel, T. Binder, R. Pacher, G. Maurer, H. Baumgartner, Natriuretic peptides predict symptom-free survival and

postoperative outcome in severe aortic stenosis, *Circulation*. 109 (2004) 2302–2308. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000126825.50903.18>.

[38] I.L. Gerber, R.A.H. Stewart, M.E. Legget, T.M. West, R.L. French, T.M. Sutton, T.G. Yandle, J.K. French, A.M. Richards, H.D. White, Increased plasma natriuretic peptide levels reflect symptom onset in aortic stenosis, *Circulation*. 107 (2003) 1884–1890. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000060533.79248.0C>.

[39] F. Antonini-Canterin, B.A. Popescu, A.C. Popescu, C.C. Beladan, R. Korcova, R. Piazza, P. Cappelletti, D. Rubin, M. Cassin, P. Faggiano, G.L. Nicolosi, Heart failure in patients with aortic stenosis: clinical and prognostic significance of carbohydrate antigen 125 and brain natriuretic peptide measurement, *Int J Cardiol*. 128 (2008) 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.05.039>.

[40] M.-A. Clavel, J. Malouf, H.I. Michelena, R.M. Suri, A.S. Jaffe, D.W. Mahoney, M. Enriquez-Sarano, B-type natriuretic peptide clinical activation in aortic stenosis: impact on long-term survival, *J Am Coll Cardiol*. 63 (2014) 2016–2025. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.02.581>.

[41] A. Vahanian, F. Beyersdorf, F. Praz, M. Milojevic, S. Baldus, J. Bauersachs, D. Capodanno, L. Conradi, M. De Bonis, R. De Paulis, V. Delgado, N. Freemantle, M. Gilard, K.H. Haugaa, A. Jeppsson, P. Jüni, L. Pierard, B.D. Prendergast, J.R. Sádaba, C. Tribouilloy, W. Wojakowski, ESC/EACTS Scientific Document Group, 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease, *Eur Heart J*. 43 (2022) 561–632. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab395>.

[42] C.W.L. Chin, A.S.V. Shah, D.A. McAllister, S. Joanna Cowell, S. Alam, J.P. Langrish, F.E. Strachan, A.L. Hunter, A. Maria Choy, C.C. Lang, S. Walker, N.A. Boon, D.E. Newby, N.L. Mills, M.R. Dweck, High-sensitivity troponin I concentrations are a marker of an advanced hypertrophic response and adverse outcomes in patients with aortic stenosis, *Eur Heart J*. 35 (2014) 2312–2321. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu189>.

[43] C.W.L. Chin, D. Messika-Zeitoun, A.S.V. Shah, G. Lefevre, S. Bailleul, E.N.W. Yeung, M. Koo, S. Mirsadraee, T. Mathieu, S.I. Semple, N.L. Mills, A. Vahanian, D.E. Newby, M.R. Dweck, A clinical risk score of myocardial fibrosis predicts adverse outcomes in aortic stenosis, *Eur Heart J*. 37 (2016) 713–723. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv525>.

[44] S.K. Elster, E. Braunwald, H.F. Wood, A study of C-reactive protein in the serum of patients with congestive heart failure, *Am Heart J*. 51 (1956) 533–541. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(56\)90099-0](https://doi.org/10.1016/0002-8703(56)90099-0).

[45] J. Swierszcz, J.S. Dubiel, J. Krzysiek, K. Sztefko, One-year observation of inflammatory markers in patients with aortic valve stenosis, *J Heart Valve Dis*. 20 (2011) 639–649.

[46] A. Blyme, C. Asferg, O.W. Nielsen, K. Boman, C. Gohlke-Bärwolf, K. Wachtell, M.H. Olsen, Increased hsCRP is associated with higher risk of aortic valve replacement in patients with aortic stenosis, *Scand Cardiovasc J*. 50 (2016) 138–145. <https://doi.org/10.3109/14017431.2016.1151928>.

[47] W.C. Meijers, A.R. van der Velde, R.A. de Boer, ST2 and Galectin-3: Ready for Prime Time?, *EJIFCC*. 27 (2016) 238–252.

[48] J.E. Ho, C. Liu, A. Lyass, P. Courchesne, M.J. Pencina, R.S. Vasan, M.G. Larson, D. Levy, Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community, *J Am Coll Cardiol*. 60 (2012) 1249–1256. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.04.053>.

- [49] J.R. Sádaba, E. Martínez-Martínez, V. Arrieta, V. Álvarez, A. Fernández-Celis, J. Ibarrola, A. Melero, P. Rossignol, V. Cachofeiro, N. López-Andrés, Role for Galectin-3 in Calcific Aortic Valve Stenosis, *J Am Heart Assoc.* 5 (2016) e004360. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004360>.
- [50] D. Arangalage, V. Nguyen, T. Robert, M. Melissopoulou, T. Mathieu, C. Estellat, I. Codogno, V. Huart, X. Duval, C. Cimadevilla, A. Vahanian, M. Dehoux, D. Messika-Zeitoun, Determinants and prognostic value of Galectin-3 in patients with aortic valve stenosis, *Heart.* 102 (2016) 862–868. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-308873>.
- [51] D. Arangalage, V. Nguyen, T. Robert, M. Melissopoulou, T. Mathieu, C. Estellat, I. Codogno, V. Huart, X. Duval, C. Cimadevilla, A. Vahanian, M. Dehoux, D. Messika-Zeitoun, Determinants and prognostic value of Galectin-3 in patients with aortic valve stenosis, *Heart.* 102 (2016) 862–868. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-308873>.
- [52] B.R. Lindman, J.G. Breyley, J.D. Schilling, A.M. Vatterott, A. Zajarias, H.S. Maniar, R.J. Damiano, M.R. Moon, J.S. Lawton, B.F. Gage, M.A. Sintek, A. Aquino, C.L. Holley, N.M. Patel, C. Lawler, J.M. Lasala, E. Novak, Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress in patients with aortic stenosis undergoing valve replacement, *Heart.* 101 (2015) 1382–1388. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307742>.
- [53] A. Synetos, K. Toutouzas, K. Stathogiannis, G. Latsios, E. Tsiamis, D. Tousoulis, C. Stefanadis, MicroRNAs in arterial hypertension, *Curr Top Med Chem.* 13 (2013) 1527–1532. <https://doi.org/10.2174/15680266113139990101>.
- [54] P. Ohukainen, S. Syväranta, J. Näpänkangas, K. Rajamäki, P. Taskinen, T. Peltonen, S. Helske-Suihko, P.T. Kovanen, H. Ruskoaho, J. Rysä, MicroRNA-125b and chemokine CCL4 expression are associated with calcific aortic valve disease, *Ann Med.* 47 (2015) 423–429. <https://doi.org/10.3109/07853890.2015.1059955>.
- [55] S. Coffey, M.J.A. Williams, L.V. Phillips, G.T. Jones, Circulating microRNA Profiling Needs Further Refinement Before Clinical Use in Patients With Aortic Stenosis, *J Am Heart Assoc.* 4 (2015) e002150. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002150>.
- [56] B. Yanagawa, F. Lovren, Y. Pan, V. Garg, A. Quan, G. Tang, K.K. Singh, P.C. Shukla, N.P. Kalra, M.D. Peterson, S. Verma, miRNA-141 is a novel regulator of BMP-2-mediated calcification in aortic stenosis, *J Thorac Cardiovasc Surg.* 144 (2012) 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.10.097>.
- [57] V. Patel, K. Carrion, A. Hollands, A. Hinton, T. Gallegos, J. Dyo, R. Sasik, E. Leire, G. Hardiman, S.A. Mohamed, S. Nigam, C.C. King, V. Nizet, V. Nigam, The stretch responsive microRNA miR-148a-3p is a novel repressor of IKBKB, NF-κB signaling, and inflammatory gene expression in human aortic valve cells, *FASEB J.* 29 (2015) 1859–1868. <https://doi.org/10.1096/fj.14-257808>.
- [58] R. Rosenhek, F. Rader, N. Loho, H. Gabriel, M. Heger, U. Klaar, M. Schemper, T. Binder, G. Maurer, H. Baumgartner, Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis, *Circulation.* 110 (2004) 1291–1295. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000140723.15274.53>.
- [59] N. Côté, A. Mahmut, D. Fournier, M.-C. Boulanger, C. Couture, J.-P. Després, S. Trahan, Y. Bossé, S. Pagé, P. Pibarot, P. Mathieu, Angiotensin receptor blockers are associated with reduced fibrosis and interleukin-6 expression in calcific aortic valve disease, *Pathobiology.* 81 (2014) 15–24. <https://doi.org/10.1159/000350896>.

- [60] M.A. Nadir, L. Wei, D.H.J. Elder, R. Libianto, T.K. Lim, M. Pauriah, S.D. Pringle, A.D. Doney, A.-M. Choy, A.D. Struthers, C.C. Lang, Impact of renin-angiotensin system blockade therapy on outcome in aortic stenosis, *J Am Coll Cardiol.* 58 (2011) 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.01.063>.
- [61] K.K. Teo, D.J. Corsi, J.W. Tam, J.G. Dumesnil, 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, *Canadian Journal of Cardiology.* 27 (2011) 800–808. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2011.03.012>.
- [62] P. Mathieu, B.J. Arsenault, M.-C. Boulanger, Y. Bossé, M.L. Koschinsky, Pathobiology of Lp(a) in calcific aortic valve disease, *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 15 (2017) 797–807. <https://doi.org/10.1080/14779072.2017.1367286>.
- [63] G. Thanassoulis, C.Y. Campbell, D.S. Owens, J.G. Smith, A.V. Smith, G.M. Peloso, K.F. Kerr, S. Pechlivanis, M.J. Budoff, T.B. Harris, R. Malhotra, K.D. O’Brien, P.R. Kamstrup, B.G. Nordestgaard, A. Tybjaerg-Hansen, M.A. Allison, T. Aspelund, M.H. Criqui, S.R. Heckbert, S.-J. Hwang, Y. Liu, M. Sjogren, J. van der Pals, H. Kälsch, T.W. Mühleisen, M.M. Nöthen, L.A. Cupples, M. Caslake, E. Di Angelantonio, J. Danesh, J.I. Rotter, S. Sigurdsson, Q. Wong, R. Erbel, S. Kathiresan, O. Melander, V. Gudnason, C.J. O’Donnell, W.S. Post, CHARGE Extracoronary Calcium Working Group, Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis, *N Engl J Med.* 368 (2013) 503–512. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109034>.
- [64] G. Thanassoulis, Lipoprotein (a) in calcific aortic valve disease: from genomics to novel drug target for aortic stenosis, *J Lipid Res.* 57 (2016) 917–924. <https://doi.org/10.1194/jlr.R051870>.
- [65] N.J. Viney, J.C. van Capelleveen, R.S. Geary, S. Xia, J.A. Tami, R.Z. Yu, S.M. Marcovina, S.G. Hughes, M.J. Graham, R.M. Crooke, S.T. Crooke, J.L. Witztum, E.S. Stroes, S. Tsimikas, Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials, *Lancet.* 388 (2016) 2239–2253. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31009-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31009-1).
- [66] V. Persy, P. D’Haese, Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox, *Trends Mol Med.* 15 (2009) 405–416. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.07.001>.
- [67] H. Fleisch, Bisphosphonates: mechanisms of action, *Endocr Rev.* 19 (1998) 80–100. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.1.0325>.
- [68] R.G. Russell, R.C. Mühlbauer, S. Bisaz, D.A. Williams, H. Fleisch, The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats, *Calcif Tissue Res.* 6 (1970) 183–196. <https://doi.org/10.1007/BF02196199>.
- [69] P.M. Chavassieux, M.E. Arlot, C. Reda, L. Wei, A.J. Yates, P.J. Meunier, Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis, *J Clin Invest.* 100 (1997) 1475–1480. <https://doi.org/10.1172/JCI119668>.
- [70] C.M. Otto, I.G. Burwash, M.E. Legget, B.I. Munt, M. Fujioka, N.L. Healy, C.D. Kraft, C.Y. Miyake-Hull, R.G. Schwaegler, Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome, *Circulation.* 95 (1997) 2262–2270. <https://doi.org/10.1161/01.cir.95.9.2262>.

- [71] C.M. Otto, A.S. Pearlman, C.L. Gardner, Hemodynamic progression of aortic stenosis in adults assessed by Doppler echocardiography, *J Am Coll Cardiol.* 13 (1989) 545–550. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90590-1](https://doi.org/10.1016/0735-1097(89)90590-1).
- [72] A.L. Innasimuthu, W.E. Katz, Effect of Bisphosphonates on the Progression of Degenerative Aortic Stenosis: Effect of Bisphosphonates on the Progression of Degenerative Aortic Stenosis, *Echocardiography.* 28 (2011) 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8175.2010.01256.x>.
- [73] A.H. Skolnick, M. Osranek, P. Formica, I. Kronzon, Osteoporosis treatment and progression of aortic stenosis, *Am J Cardiol.* 104 (2009) 122–124. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.02.051>.
- [74] V.M. Brandenburg, L.J. Schurgers, N. Kaesler, K. Püsche, R.H. van Gorp, G. Leftheriotis, S. Reinartz, R. Koos, T. Krüger, Prevention of vasculopathy by vitamin K supplementation: can we turn fiction into fact?, *Atherosclerosis.* 240 (2015) 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.040>.
- [75] B.A.G. Willems, C. Vermeer, C.P.M. Reutelingsperger, L.J. Schurgers, The realm of vitamin K dependent proteins: shifting from coagulation toward calcification, *Mol Nutr Food Res.* 58 (2014) 1620–1635. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300743>.
- [76] V.M. Brandenburg, S. Reinartz, N. Kaesler, T. Krüger, T. Dirrichs, R. Kramann, F. Peeters, J. Floege, A. Keszei, N. Marx, L.J. Schurgers, R. Koos, Slower Progress of Aortic Valve Calcification With Vitamin K Supplementation: Results From a Prospective Interventional Proof-of-Concept Study, *Circulation.* 135 (2017) 2081–2083. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.027011>.
- [77] G. Marquis-Gravel, B. Redfors, M.B. Leon, P. G n reux, Medical Treatment of Aortic Stenosis, *Circulation.* 134 (2016) 1766–1784. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023997>.
- [78] E.C.M. Cranenburg, C. Vermeer, R. Koos, M.-L. Boumans, T.M. Hackeng, F.G. Bouwman, M. Kwaijtaal, V.M. Brandenburg, M. Ketteler, L.J. Schurgers, The circulating inactive form of matrix Gla Protein (ucMGP) as a biomarker for cardiovascular calcification, *J Vasc Res.* 45 (2008) 427–436. <https://doi.org/10.1159/000124863>.
- [79] Y. Bennis, S. Vengadessane, S. Bodeau, V. Gras, G. Bricca, S. Kamel, S. Liabeuf, Les calcifications vasculaires sous anti-vitamines K : un effet indésirable méconnu, *Thérapie.* 71 (2016) 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.therap.2015.12.004>.
- [80] W.-H. Yin, Y.-T. Lee, T.-P. Tsao, J. Wei, Delayed Coronary Obstruction after Transcatheter Aortic Valve Replacement - An Uncommon But Serious Complication, *Acta Cardiol Sin.* 36 (2020) 409–415. [https://doi.org/10.6515/ACS.202009_36\(5\).20200516A](https://doi.org/10.6515/ACS.202009_36(5).20200516A).
- [81] J.D. Carroll, M.J. Mack, S. Vemulapalli, H.C. Herrmann, T.G. Gleason, G. Hanzel, G.M. Deeb, V.H. Thourani, D.J. Cohen, N. Desai, A.J. Kirtane, S. Fitzgerald, J. Michaels, C. Krohn, F.A. Masoudi, R.G. Brindis, J.E. Bavaria, STS-ACC TVT Registry of Transcatheter Aortic Valve Replacement, *J Am Coll Cardiol.* 76 (2020) 2492–2516. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.09.595>.
- [82] M.B. Leon, C.R. Smith, M. Mack, D.C. Miller, J.W. Moses, L.G. Svensson, E.M. Tuzcu, J.G. Webb, G.P. Fontana, R.R. Makkar, D.L. Brown, P.C. Block, R.A. Guyton, A.D. Pichard, J.E. Bavaria, H.C. Herrmann, P.S. Douglas, J.L. Petersen, J.J. Akin, W.N. Anderson, D. Wang, S. Pocock, PARTNER Trial Investigators, Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery, *N Engl J Med.* 363 (2010) 1597–1607. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008232>.

- [83] C.A. Hufnagel, W.P. Harvey, The surgical correction of aortic regurgitation preliminary report, *Bull Georgetown Univ Med Cent.* 6 (1953) 60–61.
- [84] J.S. Ikonomidis, J.M. Kratz, A.J. Crumbley, M.R. Stroud, S.M. Bradley, R.M. Sade, F.A. Crawford, Twenty-year experience with the St Jude Medical mechanical valve prosthesis, *J Thorac Cardiovasc Surg.* 126 (2003) 2022–2031. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2003.07.005>.
- [85] K. Hammermeister, G.K. Sethi, W.G. Henderson, F.L. Grover, C. Oprian, S.H. Rahimtoola, Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial, *J Am Coll Cardiol.* 36 (2000) 1152–1158. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(00\)00834-2](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(00)00834-2).
- [86] T.J. Tod, J.S. Dove, The association of bound aldehyde content with bioprosthetic tissue calcification, *J Mater Sci Mater Med.* 27 (2016) 8. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5623-z>.
- [87] G.L. Grunkemeier, Y. Wu, Actual versus actuarial event-free percentages, *Ann Thorac Surg.* 72 (2001) 677–678. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(01\)03059-4](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(01)03059-4).
- [88] M. Ruel, A. Kulik, F.D. Rubens, P. Bédard, R.G. Masters, A.L. Pipe, T.G. Mesana, Late incidence and determinants of reoperation in patients with prosthetic heart valves, *Eur J Cardiothorac Surg.* 25 (2004) 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2003.12.013>.
- [89] F.J. Schoen, R.J. Levy, Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention, *Ann Thorac Surg.* 79 (2005) 1072–1080. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2004.06.033>.
- [90] O. Zibdeh, I. Bugg, S. Patel, G. Twine, J. Unsworth-White, Randomized trial of the Carpentier-Edwards supra-annular prosthesis versus the Medtronic Mosaic aortic prosthesis: 10-year results, *Eur J Cardiothorac Surg.* 54 (2018) 281–287. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezx512>.
- [91] A. Anselmi, E. Flecher, C. Chabanne, V.G. Ruggieri, T. Langanay, H. Corbineau, A. Leguerrier, J.-P. Verhoye, Long-term follow-up of bioprosthetic aortic valve replacement in patients aged ≤60 years, *J Thorac Cardiovasc Surg.* 154 (2017) 1534–1541.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.05.103>.
- [92] P.M. Patel, E. Chiou, Y. Cao, J. Binongo, R.A. Guyton, B. Leshnower, K.J. Grubb, E.P. Chen, Isolated Redo Aortic Valve Replacement Versus Valve-in-Valve Transcatheter Valve Replacement, *Ann Thorac Surg.* 112 (2021) 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2020.08.048>.
- [93] M.T. Bailey, S. Pillarisetti, H. Xiao, N.R. Vyavahare, Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves, *J Biomed Mater Res A.* 66 (2003) 93–102. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10543>.
- [94] R.J. Levy, F.J. Schoen, J.T. Levy, A.C. Nelson, S.L. Howard, L.J. Oshry, Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats, *Am J Pathol.* 113 (1983) 143–155.
- [95] F.J. Schoen, Aortic valve structure-function correlations: role of elastic fibers no longer a stretch of the imagination, *J Heart Valve Dis.* 6 (1997) 1–6.
- [96] H.A. Eriksen, J. Satta, J. Risteli, M. Veijola, P. Väre, Y. Soini, Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis, *Atherosclerosis.* 189 (2006) 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.11.034>.

- [97] F.J. Schoen, Evolving Concepts of Cardiac Valve Dynamics: The Continuum of Development, Functional Structure, Pathobiology, and Tissue Engineering, *Circulation*. 118 (2008) 1864–1880. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.805911>.
- [98] G. Tao, J.D. Kotick, J. Lincoln, Heart valve development, maintenance, and disease: the role of endothelial cells, *Curr Top Dev Biol*. 100 (2012) 203–232. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387786-4.00006-3>.
- [99] S.T. Gould, S. Sriganapalan, C.A. Simmons, K.S. Anseth, Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease, *Circ Res*. 113 (2013) 186–197. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300154>.
- [100] R.S. Farivar, L.H. Cohn, E.G. Soltesz, T. Mihaljevic, J.D. Rawn, J.G. Byrne, Transcriptional profiling and growth kinetics of endothelium reveals differences between cells derived from porcine aorta versus aortic valve☆, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 24 (2003) 527–534. [https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(03\)00408-1](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(03)00408-1).
- [101] R.G. Tompkins, J.J. Schnitzer, M.L. Yarmush, Macromolecular transport within heart valves, *Circ Res*. 64 (1989) 1213–1223. <https://doi.org/10.1161/01.res.64.6.1213>.
- [102] W. Lester, A. Rosenthal, B. Granton, A.I. Gotlieb, Porcine mitral valve interstitial cells in culture, *Lab Invest*. 59 (1988) 710–719.
- [103] A.D. Durbin, A.I. Gotlieb, Advances towards understanding heart valve response to injury, *Cardiovasc Pathol*. 11 (2002) 69–77. [https://doi.org/10.1016/s1054-8807\(01\)00109-0](https://doi.org/10.1016/s1054-8807(01)00109-0).
- [104] N.M. Rajamannan, M. Subramaniam, D. Rickard, S.R. Stock, J. Donovan, M. Springett, T. Orszulak, D.A. Fullerton, A.J. Tajik, R.O. Bonow, T. Spelsberg, Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype, *Circulation*. 107 (2003) 2181–2184. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000070591.21548.69>.
- [105] E.R. Mohler, F. Gannon, C. Reynolds, R. Zimmerman, M.G. Keane, F.S. Kaplan, Bone formation and inflammation in cardiac valves, *Circulation*. 103 (2001) 1522–1528. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.11.1522>.
- [106] F.C. Caira, S.R. Stock, T.G. Gleason, E.C. McGee, J. Huang, R.O. Bonow, T.C. Spelsberg, P.M. McCarthy, S.H. Rahimtoola, N.M. Rajamannan, 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*. 47 (2006) 1707–1712. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.02.040>.
- [107] B.R. Lindman, M.-A. Clavel, P. Mathieu, B. Lung, P. Lancellotti, C.M. Otto, P. Pibarot, Calcific aortic stenosis, *Nat Rev Dis Primers*. 2 (2016) 16006. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.6>.
- [108] J. Kaden, Receptor activator of nuclear factor κB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 36 (2004) 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2003.09.015>.
- [109] Y. Tintut, L. Demer, Role of osteoprotegerin and its ligands and competing receptors in atherosclerotic calcification, *J Investig Med*. 54 (2006) 395–401. <https://doi.org/10.2310/6650.2006.06019>.

- [110] L.J. Schurgers, J. Uitto, C.P. Reutelingsperger, Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization, *Trends in Molecular Medicine*. 19 (2013) 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.008>.
- [111] E. Tantisattamo, K.H. Han, W.C. O'Neill, Increased vascular calcification in patients receiving warfarin, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 35 (2015) 237–242. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304392>.
- [112] R. Koos, V. Brandenburg, A.H. Mahnken, G. Mühlenbruch, S. Stanzel, R.W. Günther, J. Floege, W. Jahnen-Dechent, M. Kelm, H.P. Kühl, Association of fetuin-A levels with the progression of aortic valve calcification in non-dialyzed patients, *Eur Heart J*. 30 (2009) 2054–2061. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp158>.
- [113] J.J. Kaden, J.O. Reinöhl, B. Blesch, M. Brueckmann, D. Haghi, M. Borggrefe, F. Schmitz, S. Klomfass, M. Pillich, J.R. Ortlepp, Systemic and local levels of fetuin-A in calcific aortic valve stenosis, *Int J Mol Med*. 20 (2007) 193–197.
- [114] R. Capoulade, N. Côté, P. Mathieu, K.L. Chan, M.-A. Clavel, J.G. Dumesnil, K.K. Teo, J.W. Tam, D. Fournier, J.-P. Després, P. Pibarot, Circulating Levels of Matrix Gla Protein and Progression of Aortic Stenosis: A Substudy of the Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of Rosuvastatin (ASTRONOMER) Trial, *Canadian Journal of Cardiology*. 30 (2014) 1088–1095. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.03.025>.
- [115] V. Garg, A.N. Muth, J.F. Ransom, M.K. Schluterman, R. Barnes, I.N. King, P.D. Grossfeld, D. Srivastava, Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease, *Nature*. 437 (2005) 270–274. <https://doi.org/10.1038/nature03940>.
- [116] A. Galeone, D. Paparella, S. Colucci, M. Grano, G. Brunetti, The role of TNF- α and TNF superfamily members in the pathogenesis of calcific aortic valvular disease, *ScientificWorldJournal*. 2013 (2013) 875363. <https://doi.org/10.1155/2013/875363>.
- [117] C.H. Byon, A. Javed, Q. Dai, J.C. Kappes, T.L. Clemens, V.M. Darley-Usmar, J.M. McDonald, Y. Chen, Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling, *J Biol Chem*. 283 (2008) 15319–15327. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800021200>.
- [118] S.E.P. New, C. Goettsch, M. Aikawa, J.F. Marchini, M. Shibasaki, K. Yabusaki, P. Libby, C.M. Shanahan, K. Croce, E. Aikawa, Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques, *Circ Res*. 113 (2013) 72–77. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301036>.
- [119] J. Hjortnaes, K. Shapero, C. Goettsch, J.D. Hutcheson, J. Keegan, J. Kluin, J.E. Mayer, J. Bischoff, E. Aikawa, Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells, *Atherosclerosis*. 242 (2015) 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.008>.
- [120] L. Cui, N.A. Rashdan, D. Zhu, E.M. Milne, P. Ajuh, G. Milne, M.H. Helfrich, K. Lim, S. Prasad, D.A. Lerman, A.T. Vesey, M.R. Dweck, W.S. Jenkins, D.E. Newby, C. Farquharson, V.E. Macrae, End stage renal disease-induced hypercalcemia may promote aortic valve calcification via Annexin VI enrichment of valve interstitial cell derived-matrix vesicles, *J Cell Physiol*. 232 (2017) 2985–2995. <https://doi.org/10.1002/jcp.25935>.

- [121] R.B. Hinton, J. Lincoln, G.H. Deutsch, H. Osinska, P.B. Manning, D.W. Benson, K.E. Yutzey, Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves, *Circ Res.* 98 (2006) 1431–1438. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000224114.65109.4e>.
- [122] J.T. Butcher, R.M. Nerem, Valvular endothelial cells regulate the phenotype of interstitial cells in co-culture: effects of steady shear stress, *Tissue Eng.* 12 (2006) 905–915. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.905>.
- [123] J.B. Krohn, J.D. Hutcheson, E. Martínez-Martínez, E. Aikawa, Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: expanding current paradigms, *J Physiol.* 594 (2016) 2895–2903. <https://doi.org/10.1113/JP271338>.
- [124] M.C. Blaser, E. Aikawa, Roles and Regulation of Extracellular Vesicles in Cardiovascular Mineral Metabolism, *Front Cardiovasc Med.* 5 (2018) 187. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00187>.
- [125] G. van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19 (2018) 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.
- [126] N. Iraci, E. Gaude, T. Leonardi, A.S.H. Costa, C. Cossetti, L. Peruzzotti-Jametti, J.D. Bernstock, H.K. Saini, M. Gelati, A.L. Vescovi, C. Bastos, N. Faria, L.G. Occhipinti, A.J. Enright, C. Frezza, S. Pluchino, Extracellular vesicles are independent metabolic units with asparaginase activity, *Nat Chem Biol.* 13 (2017) 951–955. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2422>.
- [127] L.J. Schurgers, A.C. Akbulut, D.M. Kaczor, M. Halder, R.R. Koenen, R. Kramann, Initiation and Propagation of Vascular Calcification Is Regulated by a Concert of Platelet- and Smooth Muscle Cell-Derived Extracellular Vesicles, *Front. Cardiovasc. Med.* 5 (2018) 36. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00036>.
- [128] M. Puhka, M. Takatalo, M.-E. Nordberg, S. Valkonen, J. Nandania, M. Aatonen, M. Yliperttula, S. Laitinen, V. Velagapudi, T. Mirtti, O. Kallioniemi, A. Rannikko, P.R.-M. Siljander, T.M. af Hällström, Metabolomic Profiling of Extracellular Vesicles and Alternative Normalization Methods Reveal Enriched Metabolites and Strategies to Study Prostate Cancer-Related Changes, *Theranostics.* 7 (2017) 3824–3841. <https://doi.org/10.7150/thno.19890>.
- [129] O. Fondard, D. Detaint, B. Lung, C. Choqueux, H. Adle-Biassette, M. Jarraya, U. Hvass, J.-P. Couetil, D. Henin, J.-B. Michel, A. Vahanian, M.-P. Jacob, Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors, *Eur Heart J.* 26 (2005) 1333–1341. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi248>.
- [130] K.J. Grande-Allen, N. Osman, M.L. Ballinger, H. Dadlani, S. Marasco, P.J. Little, Glycosaminoglycan synthesis and structure as targets for the prevention of calcific aortic valve disease, *Cardiovasc Res.* 76 (2007) 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.05.014>.
- [131] R.B. Hinton, J. Lincoln, G.H. Deutsch, H. Osinska, P.B. Manning, D.W. Benson, K.E. Yutzey, Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves, *Circ Res.* 98 (2006) 1431–1438. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000224114.65109.4e>.
- [132] S.M. Arribas, A. Hinek, M.C. González, Elastic fibres and vascular structure in hypertension, *Pharmacol Ther.* 111 (2006) 771–791. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.003>.
- [133] S.E. Greenwald, Ageing of the conduit arteries, *J Pathol.* 211 (2007) 157–172. <https://doi.org/10.1002/path.2101>.

- [134] M.V. Gomez-Stallons, J.T. Tretter, K. Hassel, O. Gonzalez-Ramos, D. Amofa, N.J. Ollberding, W. Mazur, J.K. Choo, J.M. Smith, D.J. Kereiakes, K.E. Yutzey, Calcification and extracellular matrix dysregulation in human postmortem and surgical aortic valves, *Heart*. 105 (2019) 1616–1621. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2019-314879>.
- [135] T.E. Bunton, N.J. Biery, L. Myers, B. Gayraud, F. Ramirez, H.C. Dietz, Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome, *Circ Res*. 88 (2001) 37–43. <https://doi.org/10.1161/01.res.88.1.37>.
- [136] J.D. Hutcheson, C. Goettsch, M.A. Rogers, E. Aikawa, Revisiting cardiovascular calcification: A multifaceted disease requiring a multidisciplinary approach, *Semin Cell Dev Biol*. 46 (2015) 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.004>.
- [137] I. Perrotta, E. Russo, C. Camastra, G. Filice, G. Di Mizio, F. Colosimo, P. Ricci, S. Tripepi, A. Amorosi, F. Triumbari, G. Donato, New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review: Role of elastin in calcific aortic stenosis, *Histopathology*. 59 (2011) 504–513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03977.x>.
- [138] S. Helske, S. Syväranta, K.A. Lindstedt, J. Lappalainen, K. Öörni, M.I. Mäyränpää, J. Lommi, H. Turto, K. Werkkala, M. Kupari, P.T. Kovanen, Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26 (2006) 1791–1798. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000228824.01604.63>.
- [139] M.E. Edep, J. Shirani, P. Wolf, D.L. Brown, Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis, *Cardiovasc Pathol*. 9 (2000) 281–286. [https://doi.org/10.1016/s1054-8807\(00\)00043-0](https://doi.org/10.1016/s1054-8807(00)00043-0).
- [140] N. Vyavahare, P.L. Jones, S. Tallapragada, R.J. Levy, Inhibition of matrix metalloproteinase activity attenuates tenascin-C production and calcification of implanted purified elastin in rats, *Am J Pathol*. 157 (2000) 885–893. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64602-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64602-0).
- [141] M. Bailey, S. Pillarisetti, P. Jones, H. Xiao, D. Simionescu, N. Vyavahare, Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification, *Cardiovasc Pathol*. 13 (2004) 146–155. [https://doi.org/10.1016/S1054-8807\(04\)00009-2](https://doi.org/10.1016/S1054-8807(04)00009-2).
- [142] G. Hou, W.F. Vogel, M.P. Bendeck, Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression, *Circ Res*. 90 (2002) 1147–1149. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000022166.74073.f8>.
- [143] T.L. Adair-Kirk, R.M. Senior, Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation, *Int J Biochem Cell Biol*. 40 (2008) 1101–1110. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.12.005>.
- [144] S. Lehti, R. Käkelä, S. Hörkkö, O. Kumm, S. Helske-Suihko, M. Kupari, K. Werkkala, P.T. Kovanen, K. Öörni, Modified Lipoprotein-Derived Lipid Particles Accumulate in Human Stenotic Aortic Valves, *PLoS ONE*. 8 (2013) e65810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065810>.
- [145] K.D. O'Brien, D.D. Reichenbach, S.M. Marcovina, J. Kuusisto, C.E. Alpers, C.M. Otto, Apolipoproteins B, (a), and E Accumulate in the Morphologically Early Lesion of 'Degenerative' Valvular Aortic Stenosis, *ATVB*. 16 (1996) 523–532. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.16.4.523>.

- [146] C.M. Otto, J. Kuusisto, D.D. Reichenbach, A.M. Gown, K.D. O'Brien, Characterization of the early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies., *Circulation*. 90 (1994) 844–853. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.90.2.844>.
- [147] X.Z. West, N.L. Malinin, A.A. Merkulova, M. Tischenko, B.A. Kerr, E.C. Borden, E.A. Podrez, R.G. Salomon, T.V. Byzova, Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands, *Nature*. 467 (2010) 972–976. <https://doi.org/10.1038/nature09421>.
- [148] N. Venardos, N.A. Nadlonek, Q. Zhan, M.J. Weyant, T.B. Reece, X. Meng, D.A. Fullerton, Aortic valve calcification is mediated by a differential response of aortic valve interstitial cells to inflammation, *Journal of Surgical Research*. 190 (2014) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.03.051>.
- [149] K.M. Kim, Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media, *Fed Proc*. 35 (1976) 156–162.
- [150] S.S. Goel, N.S. Kleiman, W.A. Zoghbi, M.J. Reardon, S.R. Kapadia, Renin-Angiotensin System Blockade in Aortic Stenosis: Implications Before and After Aortic Valve Replacement, *J Am Heart Assoc*. 9 (2020) e016911. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016911>.
- [151] J.J. Kaden, C.-E. Dempfle, R. Grobholz, C.S. Fischer, D.C. Vocke, R. Kiliç, A. Sarikoç, R. Piñol, S. Hagl, S. Lang, M. Brueckmann, M. Borggreffe, Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis, *Cardiovasc Pathol*. 14 (2005) 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2005.01.002>.
- [152] J. Hjortnaes, J. Butcher, J.-L. Figueiredo, M. Riccio, R.H. Kohler, K.M. Kozloff, R. Weissleder, E. Aikawa, Arterial and aortic valve calcification inversely correlates with osteoporotic bone remodelling: a role for inflammation, *Eur Heart J*. 31 (2010) 1975–1984. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq237>.
- [153] P.R. Moreno, L. Astudillo, S. Elmariah, K.R. Purushothaman, M. Purushothaman, P.A. Lento, S.K. Sharma, V. Fuster, D.H. Adams, Increased macrophage infiltration and neovascularization in congenital bicuspid aortic valve stenosis, *J Thorac Cardiovasc Surg*. 142 (2011) 895–901. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.03.002>.
- [154] P.R. Goody, M.R. Hosen, D. Christmann, S.T. Niepmann, A. Zietzer, M. Adam, F. Bönner, S. Zimmer, G. Nickenig, F. Jansen, Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets, *ATVB*. 40 (2020) 885–900. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313067>.
- [155] J. Bouabdallah, K. Zibara, H. Issa, G. Lenglet, G. Kchour, T. Caus, I. Six, G. Choukroun, S. Kamel, Y. Bennis, Endothelial cells exposed to phosphate and indoxyl sulphate promote vascular calcification through interleukin-8 secretion, *Nephrol Dial Transplant*. 34 (2019) 1125–1134. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy325>.
- [156] B.J. Rollins, Chemokines, *Blood*. 90 (1997) 909–928.
- [157] B. Debnath, S. Xu, F. Grande, A. Garofalo, N. Neamati, Small molecule inhibitors of CXCR4, *Theranostics*. 3 (2013) 47–75. <https://doi.org/10.7150/thno.5376>.
- [158] P. Peveri, A. Walz, B. Dewald, M. Baggiolini, A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes, *J Exp Med*. 167 (1988) 1547–1559. <https://doi.org/10.1084/jem.167.5.1547>.

- [159] A. Walz, P. Peveri, H. Aschauer, M. Baggiolini, Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes, *Biochem Biophys Res Commun.* 149 (1987) 755–761. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(87\)90432-3](https://doi.org/10.1016/0006-291x(87)90432-3).
- [160] T. Yoshimura, K. Matsushima, S. Tanaka, E.A. Robinson, E. Appella, J.J. Oppenheim, E.J. Leonard, Pillars Article: Purification of a Human Monocyte-Derived Neutrophil Chemotactic Factor That Has Peptide Sequence Similarity to Other Host Defense Cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987. 84: 9233-9237, *J Immunol.* 202 (2019) 5–9.
- [161] J.M. Schröder, U. Mrowietz, E. Morita, E. Christophers, Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity, *J Immunol.* 139 (1987) 3474–3483.
- [162] E.T. Baldwin, I.T. Weber, R. St Charles, J.C. Xuan, E. Appella, M. Yamada, K. Matsushima, B.F. Edwards, G.M. Clore, A.M. Gronenborn, Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (1991) 502–506. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.2.502>.
- [163] D.J.J. Waugh, C. Wilson, The interleukin-8 pathway in cancer, *Clin Cancer Res.* 14 (2008) 6735–6741. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>.
- [164] R.M. Strieter, S.L. Kunkel, H.J. Showell, R.M. Marks, Monokine-induced gene expression of a human endothelial cell-derived neutrophil chemotactic factor, *Biochem Biophys Res Commun.* 156 (1988) 1340–1345. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)80779-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(88)80779-4).
- [165] J. Wanninger, M. Neumeier, J. Weigert, S. Bauer, T.S. Weiss, A. Schäffler, C. Krempl, C. Bleyl, C. Aslanidis, J. Schölmerich, C. Buechler, Adiponectin-stimulated CXCL8 release in primary human hepatocytes is regulated by ERK1/ERK2, p38 MAPK, NF-kappaB, and STAT3 signaling pathways, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 297 (2009) G611-618. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90644.2008>.
- [166] D.J. Brat, A.C. Bellail, E.G. Van Meir, The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis, *Neuro Oncol.* 7 (2005) 122–133. <https://doi.org/10.1215/S1152851704001061>.
- [167] O. Wald, O.M. Shapira, U. Izhar, CXCR4/CXCL12 axis in non small cell lung cancer (NSCLC) pathologic roles and therapeutic potential, *Theranostics.* 3 (2013) 26–33. <https://doi.org/10.7150/thno.4922>.
- [168] F. Bachelierie, A. Ben-Baruch, A.M. Burkhardt, C. Combadiere, J.M. Farber, G.J. Graham, R. Horuk, A.H. Sparre-Ulrich, M. Locati, A.D. Luster, A. Mantovani, K. Matsushima, P.M. Murphy, R. Nibbs, H. Nomiya, C.A. Power, A.E.I. Proudfoot, M.M. Rosenkilde, A. Rot, S. Sozzani, M. Thelen, O. Yoshie, A. Zlotnik, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors, *Pharmacol Rev.* 66 (2014) 1–79. <https://doi.org/10.1124/pr.113.007724>.
- [169] K. Rajarathnam, B.D. Sykes, C.M. Kay, B. Dewald, T. Geiser, M. Baggiolini, I. Clark-Lewis, Neutrophil activation by monomeric interleukin-8, *Science.* 264 (1994) 90–92. <https://doi.org/10.1126/science.8140420>.
- [170] W.E. Holmes, J. Lee, W.J. Kuang, G.C. Rice, W.I. Wood, Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor, *Science.* 253 (1991) 1278–1280. <https://doi.org/10.1126/science.1840701>.

- [171] P.M. Murphy, H.L. Tiffany, Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor, *Science*. 253 (1991) 1280–1283. <https://doi.org/10.1126/science.1891716>.
- [172] C. Kunsch, C.A. Rosen, NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter, *Mol Cell Biol*. 13 (1993) 6137–6146. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.10.6137-6146.1993>.
- [173] S.K. Ahuja, P.M. Murphy, The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor, *J Biol Chem*. 271 (1996) 20545–20550. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20545>.
- [174] R. Bonecchi, F. Facchetti, S. Dusi, W. Luini, D. Lissandrini, M. Simmelink, M. Locati, S. Bernasconi, P. Allavena, E. Brandt, F. Rossi, A. Mantovani, S. Sozzani, Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes, *J Immunol*. 164 (2000) 3862–3869. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3862>.
- [175] C. Hess, T.K. Means, P. Autissier, T. Woodberry, M. Altfeld, M.M. Addo, N. Frahm, C. Brander, B.D. Walker, A.D. Luster, IL-8 responsiveness defines a subset of CD8 T cells poised to kill, *Blood*. 104 (2004) 3463–3471. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1067>.
- [176] G. Nilsson, J.A. Mikovits, D.D. Metcalfe, D.D. Taub, Mast cell migratory response to interleukin-8 is mediated through interaction with chemokine receptor CXCR2/Interleukin-8RB, *Blood*. 93 (1999) 2791–2797.
- [177] B. Ochensberger, L. Tassera, D. Bifrare, S. Rihs, C.A. Dahinden, Regulation of cytokine expression and leukotriene formation in human basophils by growth factors, chemokines and chemotactic agonists, *Eur J Immunol*. 29 (1999) 11–22. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199901\)29:01<11::AID-IMMU11>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<11::AID-IMMU11>3.0.CO;2-B).
- [178] S.A. Jones, M. Wolf, S. Qin, C.R. Mackay, M. Baggiolini, Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2., *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93 (1996) 6682–6686. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6682>.
- [179] S. Kondo, A. Yoneta, H. Yazawa, A. Kamada, K. Jimbow, Downregulation of CXCR-2 but not CXCR-1 expression by human keratinocytes by UVB, *J Cell Physiol*. 182 (2000) 366–370. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<366::AID-JCP7>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<366::AID-JCP7>3.0.CO;2-8).
- [180] C.S. Nirodi, R. Devalaraja, L.B. Nanney, S. Arrindell, S. Russell, J. Trupin, A. Richmond, Chemokine and chemokine receptor expression in keloid and normal fibroblasts, *Wound Repair Regen*. 8 (2000) 371–382. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475x.2000.00371.x>.
- [181] R. Horuk, A.W. Martin, Z. Wang, L. Schweitzer, A. Gerassimides, H. Guo, Z. Lu, J. Hesselgesser, H.D. Perez, J. Kim, J. Parker, T.J. Hadley, S.C. Peiper, Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system, *J Immunol*. 158 (1997) 2882–2890.
- [182] R.M. Strieter, P.J. Polverini, D.A. Arenberg, A. Walz, G. Opdenakker, J. Van Damme, S.L. Kunkel, Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer, *J Leukoc Biol*. 57 (1995) 752–762. <https://doi.org/10.1002/jlb.57.5.752>.
- [183] R.M. Strieter, P.J. Polverini, D.A. Arenberg, S.L. Kunkel, The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis, *Shock*. 4 (1995) 155–160. <https://doi.org/10.1097/00024382-199509000-00001>.

- [184] L.A. Al-Alwan, Y. Chang, A. Mogas, A.J. Halayko, C.J. Baglole, J.G. Martin, S. Rousseau, D.H. Eidelman, Q. Hamid, Differential roles of CXCL2 and CXCL3 and their receptors in regulating normal and asthmatic airway smooth muscle cell migration, *J Immunol.* 191 (2013) 2731–2741. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203421>.
- [185] C. Clarke, S. Kuboki, N. Sakai, K.R. Kasten, A.D. Tevar, R. Schuster, J. Blanchard, C.C. Caldwell, M.J. Edwards, A.B. Lentsch, CXC chemokine receptor-1 is expressed by hepatocytes and regulates liver recovery after hepatic ischemia/reperfusion injury, *Hepatology.* 53 (2011) 261–271. <https://doi.org/10.1002/hep.24028>.
- [186] L.W. Horton, Y. Yu, S. Zaja-Milatovic, R.M. Strieter, A. Richmond, Opposing roles of murine duffy antigen receptor for chemokine and murine CXC chemokine receptor-2 receptors in murine melanoma tumor growth, *Cancer Res.* 67 (2007) 9791–9799. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0246>.
- [187] A.E. Koch, P.J. Polverini, S.L. Kunkel, L.A. Harlow, L.A. DiPietro, V.M. Elner, S.G. Elner, R.M. Strieter, Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis, *Science.* 258 (1992) 1798–1801. <https://doi.org/10.1126/science.1281554>.
- [188] R.M. Strieter, P.J. Polverini, S.L. Kunkel, D.A. Arenberg, M.D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Van Damme, A. Walz, D. Marriott, The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis, *J Biol Chem.* 270 (1995) 27348–27357. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.27348>.
- [189] B.B. Damaj, S.R. McColl, K. Neote, C.A. Hébert, P.H. Naccache, Diverging Signal Transduction Pathways Activated by Interleukin 8 (IL-8) and Related Chemokines in Human Neutrophils, *Journal of Biological Chemistry.* 271 (1996) 20540–20544. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20540>.
- [190] D. Wu, G. LaRosa, M. Simon, G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8, *Science.* 261 (1993) 101–103. <https://doi.org/10.1126/science.8316840>.
- [191] Y. Wu, S. Wang, S.M. Farooq, M.P. Castelvete, Y. Hou, J.-L. Gao, J.V. Navarro, D. Oupicky, F. Sun, C. Li, A chemokine receptor CXCR2 macromolecular complex regulates neutrophil functions in inflammatory diseases, *J Biol Chem.* 287 (2012) 5744–5755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.315762>.
- [192] B.B. Damaj, S.R. McColl, W. Mahana, M.F. Crouch, P.H. Naccache, Physical association of Gi2alpha with interleukin-8 receptors, *J Biol Chem.* 271 (1996) 12783–12789. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.12783>.
- [193] C. Knall, G.S. Worthen, G.L. Johnson, Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (1997) 3052–3057. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3052>.
- [194] D. Xythalis, M.B. Frewin, P.W. Gudewicz, Inhibition of IL-8-mediated MAPK activation in human neutrophils by beta1 integrin ligands, *Inflammation.* 26 (2002) 83–88. <https://doi.org/10.1023/a:1014836211643>.
- [195] G.M. Fuhler, G.J. Knol, A.L. Drayer, E. Vellenga, Impaired interleukin-8- and GROalpha-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase result in decreased migration of neutrophils from patients with myelodysplasia, *J Leukoc Biol.* 77 (2005) 257–266. <https://doi.org/10.1189/jlb.0504306>.

- [196] C. Knall, S. Young, J.A. Nick, A.M. Buhl, G.S. Worthen, G.L. Johnson, Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils, *J Biol Chem.* 271 (1996) 2832–2838. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.5.2832>.
- [197] R. Roskoski, ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation, *Pharmacol Res.* 66 (2012) 105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>.
- [198] H.C. Lane, A.R. Anand, R.K. Ganju, Cbl and Akt regulate CXCL8-induced and CXCR1- and CXCR2-mediated chemotaxis, *Int Immunol.* 18 (2006) 1315–1325. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl064>.
- [199] D.J.J. Waugh, C. Wilson, The interleukin-8 pathway in cancer, *Clin Cancer Res.* 14 (2008) 6735–6741. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>.
- [200] E. Cohen-Hillel, I. Yron, T. Meshel, G. Soria, H. Attal, A. Ben-Baruch, CXCL8-induced FAK phosphorylation via CXCR1 and CXCR2: cytoskeleton- and integrin-related mechanisms converge with FAK regulatory pathways in a receptor-specific manner, *Cytokine.* 33 (2006) 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.11.006>.
- [201] R. Feniger-Barish, I. Yron, T. Meshel, E. Matityahu, A. Ben-Baruch, IL-8-induced migratory responses through CXCR1 and CXCR2: association with phosphorylation and cellular redistribution of focal adhesion kinase, *Biochemistry.* 42 (2003) 2874–2886. <https://doi.org/10.1021/bi026783d>.
- [202] I.U. Schraufstatter, J. Chung, M. Burger, IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280 (2001) L1094–L1103. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.280.6.L1094>.
- [203] G.P. L’Heureux, S. Bourgoin, N. Jean, S.R. McColl, P.H. Naccache, Diverging signal transduction pathways activated by interleukin-8 and related chemokines in human neutrophils: interleukin-8, but not NAP-2 or GRO alpha, stimulates phospholipase D activity, *Blood.* 85 (1995) 522–531.
- [204] R.M. Richardson, H. Ali, B.C. Pridgen, B. Haribabu, R. Snyderman, Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A. Independent regulation by phosphorylation, *J Biol Chem.* 273 (1998) 10690–10695. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10690>.
- [205] S. Sozzani, D.E. Agwu, M.D. Ellenburg, M. Locati, M. Rieppi, A. Rojas, A. Mantovani, L.C. McPhail, Activation of phospholipase D by interleukin-8 in human neutrophils, *Blood.* 84 (1994) 3895–3901.
- [206] G.N. Prado, H. Suzuki, N. Wilkinson, B. Cousins, J. Navarro, Role of the C terminus of the interleukin 8 receptor in signal transduction and internalization, *J Biol Chem.* 271 (1996) 19186–19190. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.32.19186>.
- [207] S.K. Raghuwanshi, Y. Su, V. Singh, K. Haynes, A. Richmond, R.M. Richardson, The chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 couple to distinct G protein-coupled receptor kinases to mediate and regulate leukocyte functions, *J Immunol.* 189 (2012) 2824–2832. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201114>.
- [208] A. Wuyts, N. Van Osselaer, A. Haelens, I. Samson, P. Herdewijn, A. Ben-Baruch, J.J. Oppenheim, P. Proost, J. Van Damme, Characterization of Synthetic Human Granulocyte Chemotactic Protein 2: Usage of Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 and *in Vivo* Inflammatory Properties[†], *Biochemistry.* 36 (1997) 2716–2723. <https://doi.org/10.1021/bi961999z>.

- [209] M.W. Nasser, S.K. Raghuwanshi, D.J. Grant, V.R. Jala, K. Rajarathnam, R.M. Richardson, Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer, *J Immunol.* 183 (2009) 3425–3432. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900305>.
- [210] A. Chuntharapai, K.J. Kim, Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor, *J Immunol.* 155 (1995) 2587–2594.
- [211] D. Hartl, P. Latzin, P. Hordijk, V. Marcos, C. Rudolph, M. Woischnik, S. Krauss-Etschmann, B. Koller, D. Reinhardt, A.A. Roscher, D. Roos, M. Griese, Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease, *Nat Med.* 13 (2007) 1423–1430. <https://doi.org/10.1038/nm1690>.
- [212] C.L. Addison, T.O. Daniel, M.D. Burdick, H. Liu, J.E. Ehlert, Y.Y. Xue, L. Buechi, A. Walz, A. Richmond, R.M. Strieter, The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity, *J Immunol.* 165 (2000) 5269–5277. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.9.5269>.
- [213] M.P. Keane, J.A. Belperio, Y.Y. Xue, M.D. Burdick, R.M. Strieter, Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer, *J Immunol.* 172 (2004) 2853–2860. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2853>.
- [214] S. Singh, S. Wu, M. Varney, A.P. Singh, R.K. Singh, CXCR1 and CXCR2 silencing modulates CXCL8-dependent endothelial cell proliferation, migration and capillary-like structure formation, *Microvasc Res.* 82 (2011) 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2011.06.011>.
- [215] H.G. Rus, R. Vlaicu, F. Niculescu, Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall, *Atherosclerosis.* 127 (1996) 263–271. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(96\)05968-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(96)05968-0).
- [216] J. Apostolopoulos, P. Davenport, P.G. Tipping, Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16 (1996) 1007–1012. <https://doi.org/10.1161/01.atv.16.8.1007>.
- [217] Y. Liu, L.M. Hultén, O. Wiklund, Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17 (1997) 317–323. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.2.317>.
- [218] R.E. Gerszten, E.A. Garcia-Zepeda, Y.C. Lim, M. Yoshida, H.A. Ding, M.A. Gimbrone, A.D. Luster, F.W. Luscinskas, A. Rosenzweig, MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions, *Nature.* 398 (1999) 718–723. <https://doi.org/10.1038/19546>.
- [219] M. Moreau, I. Brocheriou, L. Petit, E. Ninio, M.J. Chapman, M. Rouis, Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque, *Circulation.* 99 (1999) 420–426. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.3.420>.
- [220] T.L. Yue, X. Wang, C.P. Sung, B. Olson, P.J. McKenna, J.L. Gu, G.Z. Feuerstein, Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells, *Circ Res.* 75 (1994) 1–7. <https://doi.org/10.1161/01.res.75.1.1>.

- [221] A. Simonini, M. Moscucci, D.W. Muller, E.R. Bates, F.D. Pagani, M.D. Burdick, R.M. Strieter, IL-8 is an angiogenic factor in human coronary atherectomy tissue, *Circulation*. 101 (2000) 1519–1526. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.13.1519>.
- [222] E.M. Boyle, J.C. Kovacich, C.A. Hèbert, T.G. Canty, E. Chi, E.N. Morgan, T.H. Pohlman, E.D. Verrier, Inhibition of interleukin-8 blocks myocardial ischemia-reperfusion injury, *J Thorac Cardiovasc Surg*. 116 (1998) 114–121. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(98\)70249-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(98)70249-1).
- [223] T. Inoue, H. Komoda, M. Nonaka, M. Kameda, T. Uchida, K. Node, Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease, *Int J Cardiol*. 124 (2008) 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.02.012>.
- [224] C. Herder, J. Baumert, B. Thorand, S. Martin, H. Löwel, H. Kolb, W. Koenig, Chemokines and incident coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984–2002, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26 (2006) 2147–2152. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000235691.84430.86>.
- [225] E. Romuk, B. Skrzep-Poloczek, C. Wojciechowska, A. Tomasik, E. Birkner, J. Wodniecki, B. Gabrylewicz, A. Ochala, M. Tendera, Selectin-P and interleukin-8 plasma levels in coronary heart disease patients, *Eur J Clin Invest*. 32 (2002) 657–661. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2002.01053.x>.
- [226] S. Hashmi, Q.T. Zeng, Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease, *Coron Artery Dis*. 17 (2006) 699–706. <https://doi.org/10.1097/01.mca.0000236288.94553.b4>.
- [227] C.-S. Kim, H.-S. Park, T. Kawada, J.-H. Kim, D. Lim, N.E. Hubbard, B.-S. Kwon, K.L. Erickson, R. Yu, Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters, *Int J Obes (Lond)*. 30 (2006) 1347–1355. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803259>.
- [228] M. Trøseid, K.T. Lappegård, T. Claudi, J.K. Damås, L. Mørkrid, R. Brendberg, T.E. Mollnes, Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome, *Eur Heart J*. 25 (2004) 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.ehj.2003.12.006>.
- [229] E. Elmas, S. Lang, C.E. Dempfle, T. Kälsch, D. Hannak, T. Sueselbeck, C. Wolpert, M. Borggreffe, M. Brueckmann, High plasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and interleukin-8 (IL-8) characterize patients prone to ventricular fibrillation complicating myocardial infarction, *Clin Chem Lab Med*. 45 (2007) 1360–1365. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.286>.
- [230] V. Panichi, D. Taccola, G.M. Rizza, C. Consani, L. Ghiadoni, C. Filippi, R. Cristofani, E. Panicucci, M. Migliori, A. Sidoti, M. Biagioli, D. Boracelli, G. Barsotti, C. Tetta, Interleukin-8 is a powerful prognostic predictor of all-cause and cardiovascular mortality in dialytic patients, *Nephron Clin Pract*. 102 (2006) c51–58. <https://doi.org/10.1159/000088923>.
- [231] M.K. Vidula, A. Orlenko, L. Zhao, L. Salvador, A.M. Small, E. Horton, J.B. Cohen, S. Adusumalli, S. Denduluri, T. Kobayashi, M. Hyman, P. Fiorilli, C. Magro, B. Singh, B. Pourmussa, C. Greczylo, M. Basso, C. Ebert, M. Yarde, Z. Li, M.E. Cvijic, Z. Wang, A. Walsh, J. Maranville, E. Kick, J. Luetzgen, L. Adam, P. Schafer, F. Ramirez-Valle, D. Seiffert, J.H. Moore, D. Gordon, J.A. Chirinos, Plasma biomarkers associated with adverse outcomes in patients with calcific aortic stenosis, *Eur J Heart Fail*. 23 (2021) 2021–2032. <https://doi.org/10.1002/ejhf.2361>.

- [232] M. Drechsler, R.T.A. Megens, M. van Zandvoort, C. Weber, O. Soehnlein, Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis, *Circulation*. 122 (2010) 1837–1845. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.961714>.
- [233] W.A. Boisvert, D.M. Rose, K.A. Johnson, M.E. Fuentes, S.A. Lira, L.K. Curtiss, R.A. Terkeltaub, Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression, *Am J Pathol*. 168 (2006) 1385–1395. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.040748>.
- [234] W.A. Boisvert, R. Santiago, L.K. Curtiss, R.A. Terkeltaub, A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice, *J Clin Invest*. 101 (1998) 353–363. <https://doi.org/10.1172/JCI1195>.
- [235] C. Weber, S. Kraemer, M. Drechsler, H. Lue, R.R. Koenen, A. Kapurniotu, A. Zerneck, J. Bernhagen, Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105 (2008) 16278–16283. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804017105>.
- [236] O. Soehnlein, M. Drechsler, Y. Döring, D. Lievens, H. Hartwig, K. Kemmerich, A. Ortega-Gómez, M. Mandl, S. Vijayan, D. Projahn, C.D. Garlachs, R.R. Koenen, M. Hristov, E. Lutgens, A. Zerneck, C. Weber, Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes, *EMBO Mol Med*. 5 (2013) 471–481. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201717>.
- [237] M. Dewor, G. Steffens, R. Krohn, C. Weber, J. Baron, J. Bernhagen, Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes fibroblast migration in scratch-wounded monolayers in vitro, *FEBS Lett*. 581 (2007) 4734–4742. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.08.071>.
- [238] O. Soehnlein, M. Drechsler, Y. Döring, D. Lievens, H. Hartwig, K. Kemmerich, A. Ortega-Gómez, M. Mandl, S. Vijayan, D. Projahn, C.D. Garlachs, R.R. Koenen, M. Hristov, E. Lutgens, A. Zerneck, C. Weber, Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes, *EMBO Mol Med*. 5 (2013) 471–481. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201717>.
- [239] I. Bot, S.C.A. de Jager, A. Zerneck, K.A. Lindstedt, T.J.C. van Berkel, C. Weber, E.A.L. Biessen, Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice, *Circulation*. 115 (2007) 2516–2525. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660472>.
- [240] D. Wu, N. Nishimura, V. Kuo, O. Fiehn, S. Shahbaz, L. Van Winkle, F. Matsumura, C.F.A. Vogel, Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor Induces Vascular Inflammation and Promotes Atherosclerosis in Apolipoprotein E-/- Mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31 (2011) 1260–1267. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.220202>.
- [241] R.M. Devalaraja, L.B. Nanney, J. Du, Q. Qian, Y. Yu, M.N. Devalaraja, A. Richmond, Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice, *J Invest Dermatol*. 115 (2000) 234–244. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00034.x>.
- [242] D.G. Souza, R. Bertini, A.T. Vieira, F.Q. Cunha, S. Poole, M. Allegretti, F. Colotta, M.M. Teixeira, Repertaxin, a novel inhibitor of rat CXCR2 function, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury, *Br J Pharmacol*. 143 (2004) 132–142. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705862>.

- [243] C. Clarke, S. Kuboki, N. Sakai, K.R. Kasten, A.D. Tevar, R. Schuster, J. Blanchard, C.C. Caldwell, M.J. Edwards, A.B. Lentsch, CXCR2 chemokine receptor-1 is expressed by hepatocytes and regulates liver recovery after hepatic ischemia/reperfusion injury, *Hepatology*. 53 (2011) 261–271. <https://doi.org/10.1002/hep.24028>.
- [244] R. Bertini, L.S. Barcelos, A.R. Beccari, B. Cavalieri, A. Moriconi, C. Bizzarri, P. Di Benedetto, C. Di Giacinto, I. Gloaguen, E. Galliera, M.M. Corsi, R.C. Russo, S.P. Andrade, M.C. Cesta, G. Nano, A. Aramini, J.C. Cutrin, M. Locati, M. Allegretti, M.M. Teixeira, Receptor binding mode and pharmacological characterization of a potent and selective dual CXCR1/CXCR2 non-competitive allosteric inhibitor, *Br J Pharmacol*. 165 (2012) 436–454. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01566.x>.
- [245] T.H.C. de Oliveira, P.E. Marques, F. Poosti, P. Ruytinx, F.A. Amaral, L. Brandolini, M. Allegretti, P. Proost, M.M. Teixeira, Intravital Microscopic Evaluation of the Effects of a CXCR2 Antagonist in a Model of Liver Ischemia Reperfusion Injury in Mice, *Front. Immunol*. 8 (2018) 1917. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01917>.
- [246] J.A. Belperio, M.P. Keane, M.D. Burdick, B.N. Gomperts, Y.Y. Xue, K. Hong, J. Mestas, D. Zisman, A. Ardehali, R. Saggar, J.P. Lynch, D.J. Ross, R.M. Strieter, CXCR2/CXCR2 ligand biology during lung transplant ischemia-reperfusion injury, *J Immunol*. 175 (2005) 6931–6939. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6931>.
- [247] A. Sukkar, J. Jenkins, J. Sánchez, E.M. Wagner, Inhibition of CXCR2 attenuates bronchial angiogenesis in the ischemic rat lung, *J Appl Physiol* (1985). 104 (2008) 1470–1475. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00974.2007>.
- [248] A.J. Turunen, L. Lindgren, K.T. Salmela, L.E. Kyllönen, H. Mäkitalo, S.M. Siitonen, E.J. Pesonen, ASSOCIATION OF GRAFT NEUTROPHIL SEQUESTRATION WITH DELAYED GRAFT FUNCTION IN CLINICAL RENAL TRANSPLANTATION, *Transplantation*. 77 (2004) 1821–1826. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000122231.43653.CC>.
- [249] D. Cugini, N. Azzollini, E. Gagliardini, P. Cassis, R. Bertini, F. Colotta, M. Noris, G. Remuzzi, A. Benigni, Inhibition of the chemokine receptor CXCR2 prevents kidney graft function deterioration due to ischemia/reperfusion, *Kidney Int*. 67 (2005) 1753–1761. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00272.x>.
- [250] S.T. Tarzami, W. Miao, K. Mani, L. Lopez, S.M. Factor, J.W. Berman, R.N. Kitsis, Opposing effects mediated by the chemokine receptor CXCR2 on myocardial ischemia-reperfusion injury: recruitment of potentially damaging neutrophils and direct myocardial protection, *Circulation*. 108 (2003) 2387–2392. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093192.72099.9A>.
- [251] R. Bertini, M. Allegretti, C. Bizzarri, A. Moriconi, M. Locati, G. Zampella, M.N. Cervellera, V. Di Cioccio, M.C. Cesta, E. Galliera, F.O. Martinez, R. Di Bitondo, G. Troiani, V. Sabbatini, G. D'Anniballe, R. Anacardio, J.C. Cutrin, B. Cavalieri, F. Mainiero, R. Strippoli, P. Villa, M. Di Girolamo, F. Martin, M. Gentile, A. Santoni, D. Corda, G. Poli, A. Mantovani, P. Ghezzi, F. Colotta, Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: prevention of reperfusion injury, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 (2004) 11791–11796. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402090101>.
- [252] B.J. Connell, J.R. Gordon, T.M. Saleh, ELR-CXC chemokine antagonism is neuroprotective in a rat model of ischemic stroke, *Neurosci Lett*. 606 (2015) 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.08.041>.

- [253] M. Serdar, K. Kempe, R. Herrmann, D. Picard, M. Remke, J. Herz, I. Bendix, U. Felderhoff-Müser, H. Sabir, Involvement of CXCL1/CXCR2 During Microglia Activation Following Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats, *Front Neurol.* 11 (2020) 540878. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.540878>.
- [254] S.T. Tarzami, W. Miao, K. Mani, L. Lopez, S.M. Factor, J.W. Berman, R.N. Kitsis, Opposing Effects Mediated by the Chemokine Receptor CXCR2 on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury: Recruitment of Potentially Damaging Neutrophils and Direct Myocardial Protection, *Circulation.* 108 (2003) 2387–2392. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093192.72099.9A>.
- [255] Y.R. Timasheva, T.R. Nasibullin, O.E. Mustafina, The CXCR2 Gene Polymorphism Is Associated with Stroke in Patients with Essential Hypertension, *Cerebrovasc Dis Extra.* 5 (2015) 124–131. <https://doi.org/10.1159/000441529>.
- [256] L. Wang, Y.-L. Zhang, Q.-Y. Lin, Y. Liu, X.-M. Guan, X.-L. Ma, H.-J. Cao, Y. Liu, J. Bai, Y.-L. Xia, J. Du, H.-H. Li, CXCL1–CXCR2 axis mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodelling through regulation of monocyte infiltration, *European Heart Journal.* 39 (2018) 1818–1831. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy085>.
- [257] Y.-L. Zhang, C. Geng, J. Yang, J. Fang, X. Yan, P.-B. Li, L.-X. Zou, C. Chen, S.-B. Guo, H.-H. Li, Y. Liu, Chronic inhibition of chemokine receptor CXCR2 attenuates cardiac remodeling and dysfunction in spontaneously hypertensive rats, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1865 (2019) 165551. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165551>.
- [258] L. Wang, X.-C. Zhao, W. Cui, Y.-Q. Ma, H.-L. Ren, X. Zhou, J. Fassett, Y.-Z. Yang, Y. Chen, Y.-L. Xia, J. Du, H.-H. Li, Genetic and Pharmacologic Inhibition of the Chemokine Receptor CXCR2 Prevents Experimental Hypertension and Vascular Dysfunction, *Circulation.* 134 (2016) 1353–1368. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020754>.
- [259] S. He, Y. Lu, Y. Guo, S. Li, X. Lu, S. Shao, H. Zhou, R. Wang, J. Wang, P. Gao, X. Li, Krüppel-Like Factor 15 Modulates CXCL1/CXCR2 Signaling-Mediated Inflammatory Response Contributing to Angiotensin II-Induced Cardiac Remodeling, *Front Cell Dev Biol.* 9 (2021) 644954. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.644954>.
- [260] Y.-L. Zhang, F. Teng, X. Han, P.-B. Li, X. Yan, S.-B. Guo, H.-H. Li, Selective blocking of CXCR2 prevents and reverses atrial fibrillation in spontaneously hypertensive rats, *J Cell Mol Med.* 24 (2020) 11272–11282. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15694>.
- [261] R.J. Levy, F.J. Schoen, J.T. Levy, A.C. Nelson, S.L. Howard, L.J. Oshry, Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats, *Am J Pathol.* 113 (1983) 143–155.
- [262] E. Diaz-Jaunanen, R.G. Strickland, R.C. Williams, Studies of human lymphocytes in the newborn and the aged, *Am J Med.* 58 (1975) 620–628. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(75\)90497-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(75)90497-0).
- [263] I. Goczalik, E. Ulbricht, M. Hollborn, M. Raap, S. Uhlmann, M. Weick, T. Pannicke, P. Wiedemann, A. Bringmann, A. Reichenbach, M. Francke, Expression of CXCL8, CXCR1, and CXCR2 in neurons and glial cells of the human and rabbit retina, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49 (2008) 4578–4589. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-1887>.
- [264] S. Cui, L. Qiao, S. Yu, L. Men, Y. Li, F. Li, J. Du, The antagonist of CXCR1 and CXCR2 protects *db/db* mice from metabolic diseases through modulating inflammation, *American Journal of*

[265] H. Bi, Y. Zhang, S. Wang, W. Fang, W. He, L. Yin, Y. Xue, Z. Cheng, M. Yang, J. Shen, Interleukin-8 promotes cell migration via CXCR1 and CXCR2 in liver cancer, *Oncol Lett.* (2019). <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10735>.

[266] L.A. Al-Alwan, Y. Chang, A. Mogas, A.J. Halayko, C.J. Baglolle, J.G. Martin, S. Rousseau, D.H. Eidelman, Q. Hamid, Differential roles of CXCL2 and CXCL3 and their receptors in regulating normal and asthmatic airway smooth muscle cell migration, *J Immunol.* 191 (2013) 2731–2741. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203421>.

[267] J.M. Schröder, U. Mrowietz, E. Morita, E. Christophers, Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity, *J Immunol.* 139 (1987) 3474–3483.

[268] T. Yoshimura, K. Matsushima, S. Tanaka, E.A. Robinson, E. Appella, J.J. Oppenheim, E.J. Leonard, Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84 (1987) 9233–9237. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9233>.

[269] A. Chuntharapai, K.J. Kim, Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor, *J Immunol.* 155 (1995) 2587–2594.

[270] S.G. Pereira, F. Oakley, Nuclear factor-kappaB1: regulation and function, *Int J Biochem Cell Biol.* 40 (2008) 1425–1430. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.05.004>.

[271] Q. Zhan, R. Song, Q. Zeng, Q. Yao, L. Ao, D. Xu, D.A. Fullerton, X. Meng, Activation of TLR3 Induces Osteogenic Responses in Human Aortic Valve Interstitial Cells through the NF- κ B and ERK1/2 Pathways, *Int. J. Biol. Sci.* 11 (2015) 482–493. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10905>.

[272] H. Hsu, H.B. Shu, M.G. Pan, D.V. Goeddel, TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways, *Cell.* 84 (1996) 299–308. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80984-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80984-8).

[273] K. Isoda, T. Matsuki, H. Kondo, Y. Iwakura, F. Ohsuzu, Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30 (2010) 708–715. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.201749>.

[274] H. Wajant, K. Pfizenmaier, P. Scheurich, Tumor necrosis factor signaling, *Cell Death Differ.* 10 (2003) 45–65. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189>.

[275] M. Karin, Y. Yamamoto, Q.M. Wang, The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development, *Nat Rev Drug Discov.* 3 (2004) 17–26. <https://doi.org/10.1038/nrd1279>.

[276] G. Zhao, M.-J. Xu, M.-M. Zhao, X.-Y. Dai, W. Kong, G.M. Wilson, Y. Guan, C.-Y. Wang, X. Wang, Activation of nuclear factor-kappa B accelerates vascular calcification by inhibiting ankylosis protein homolog expression, *Kidney Int.* 82 (2012) 34–44. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.40>.

[277] D. Zhang, X. Bi, Y. Liu, Y. Huang, J. Xiong, X. Xu, T. Xiao, Y. Yu, W. Jiang, Y. Huang, J. Zhang, B. Zhang, J. Zhao, High Phosphate-Induced Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells is Associated with the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway, *Kidney Blood Press Res.* 42 (2017) 1205–1215. <https://doi.org/10.1159/000485874>.

- [278] M. Berridge, P. Lipp, M. Bootman, Calcium signalling, *Current Biology*. 9 (1999) R157–R159. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80101-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80101-8).
- [279] S. Rajagopal, D.L. Bassoni, J.J. Campbell, N.P. Gerard, C. Gerard, T.S. Wehrman, Biased Agonism as a Mechanism for Differential Signaling by Chemokine Receptors, *Journal of Biological Chemistry*. 288 (2013) 35039–35048. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.479113>.
- [280] W. Gonsiorek, X. Fan, D. Hesk, J. Fossetta, H. Qiu, J. Jakway, M. Billah, M. Dwyer, J. Chao, G. Deno, A. Taveras, D.J. Lundell, R.W. Hipkin, Pharmacological characterization of Sch527123, a potent allosteric CXCR1/CXCR2 antagonist, *J Pharmacol Exp Ther*. 322 (2007) 477–485. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.118927>.
- [281] S.I. Rennard, D.C. Dale, J.F. Donohue, F. Kannies, H. Magnussen, E.R. Sutherland, H. Watz, S. Lu, P. Stryczak, E. Rosenberg, H. Staudinger, CXCR2 Antagonist MK-7123. A Phase 2 Proof-of-Concept Trial for Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Am J Respir Crit Care Med*. 191 (2015) 1001–1011. <https://doi.org/10.1164/rccm.201405-0992OC>.
- [282] H.-M. Shin, M.-H. Kim, B.H. Kim, S.-H. Jung, Y.S. Kim, H.J. Park, J.T. Hong, K.R. Min, Y. Kim, Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF-kappaB without affecting IkappaB degradation, *FEBS Lett*. 571 (2004) 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.056>.
- [283] J.J. Kaden, S. Bickelhaupt, R. Grobholz, C.F. Vahl, S. Hagl, M. Brueckmann, K.K. Haase, C.-E. Dempfle, M. Borggreffe, Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis, *J Heart Valve Dis*. 13 (2004) 560–566.
- [284] X. Yang, X. Meng, X. Su, D.C. Mauchley, L. Ao, J.C. Cleveland, D.A. Fullerton, Bone morphogenetic 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*. 138 (2009) 1008–1015. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.06.024>.
- [285] E.R. Mohler, F. Gannon, C. Reynolds, R. Zimmerman, M.G. Keane, F.S. Kaplan, Bone formation and inflammation in cardiac valves, *Circulation*. 103 (2001) 1522–1528. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.11.1522>.
- [286] J.J. Kaden, S. Bickelhaupt, R. Grobholz, C.F. Vahl, S. Hagl, M. Brueckmann, K.K. Haase, C.-E. Dempfle, M. Borggreffe, Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis, *J Heart Valve Dis*. 13 (2004) 560–566.
- [287] S.A. Steitz, M.Y. Speer, M.D. McKee, L. Liaw, M. Almeida, H. Yang, C.M. Giachelli, Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification, *Am J Pathol*. 161 (2002) 2035–2046. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64482-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64482-3).
- [288] E.R. Mohler, L.P. Adam, P. McClelland, L. Graham, D.R. Hathaway, Detection of osteopontin in calcified human aortic valves, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17 (1997) 547–552. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.3.547>.
- [289] K.D. O'Brien, J. Kuusisto, D.D. Reichenbach, M. Ferguson, C. Giachelli, C.E. Alpers, C.M. Otto, Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions, *Circulation*. 92 (1995) 2163–2168. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.8.2163>.

- [290] E. Nagy, P. Eriksson, M. Yousry, K. Caidahl, E. Ingelsson, G.K. Hansson, A. Franco-Cereceda, M. Bäck, Valvular osteoclasts in calcification and aortic valve stenosis severity, *Int J Cardiol.* 168 (2013) 2264–2271. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.207>.
- [291] M. Shen, P. Marie, D. Farge, S. Carpentier, C. De Pollak, M. Hott, L. Chen, B. Martinet, A. Carpentier, Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans, *C R Acad Sci III.* 320 (1997) 49–57. [https://doi.org/10.1016/s0764-4469\(99\)80086-9](https://doi.org/10.1016/s0764-4469(99)80086-9).
- [292] J. Liang, E. Liu, Y. Yu, S. Kitajima, T. Koike, Y. Jin, M. Morimoto, K. Hatakeyama, Y. Asada, T. Watanabe, Y. Sasaguri, S. Watanabe, J. Fan, Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits, *Circulation.* 113 (2006) 1993–2001. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.596031>.
- [293] G.M. Longo, S.J. Buda, N. Fiotta, W. Xiong, T. Griener, S. Shapiro, B.T. Baxter, MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice, *Surgery.* 137 (2005) 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2004.12.004>.
- [294] I. Perrotta, E. Russo, C. Camastra, G. Filice, G. Di Mizio, F. Colosimo, P. Ricci, S. Tripepi, A. Amorosi, F. Triumbari, G. Donato, New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review, *Histopathology.* 59 (2011) 504–513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03977.x>.
- [295] Y. Bossé, A. Miqdad, D. Fournier, A. Pépin, P. Pibarot, 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.* 2 (2009) 489–498. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.820795>.
- [296] X.-S. Deng, X. Meng, F. Li, N. Venardos, D. Fullerton, J. Jagers, MMP-12-Induced Pro-osteogenic Responses in Human Aortic Valve Interstitial Cells, *J Surg Res.* 235 (2019) 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.09.005>.
- [297] M.V. Gomez-Stallons, J.T. Tretter, K. Hassel, O. Gonzalez-Ramos, D. Amofa, N.J. Ollberding, W. Mazur, J.K. Choo, J.M. Smith, D.J. Kereiakes, K.E. Yutzey, Calcification and extracellular matrix dysregulation in human postmortem and surgical aortic valves, *Heart.* 105 (2019) 1616–1621. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2019-314879>.
- [298] M. Li, L. Zhou, S. Li, L. Fang, L. Yang, X. Wu, C. Yang, Y. Bao, S. Lan, Z. Tong, S. Zheng, B. Tang, E. Zeng, S. Xie, C. Chen, T. Hong, MMP12 is a potential therapeutic target for Adamantinomatous craniopharyngioma: Conclusions from bioinformatics analysis and in vitro experiments, *Oncol Lett.* 22 (2021) 536. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12797>.
- [299] J. Li, J.J. Wang, Q. Peng, C. Chen, M.B. Humphrey, J. Heinecke, S.X. Zhang, Macrophage metalloelastase (MMP-12) deficiency mitigates retinal inflammation and pathological angiogenesis in ischemic retinopathy, *PLoS One.* 7 (2012) e52699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052699>.
- [300] M. Neelgundmath, K.R. Dinesh, C.D. Mohan, F. Li, X. Dai, K.S. Siveen, S. Paricharak, D.J. Mason, J.E. Fuchs, G. Sethi, A. Bender, K.S. Rangappa, O. Kotresh, Basappa, Novel synthetic coumarins that targets NF- κ B in Hepatocellular carcinoma, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 25 (2015) 893–897. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.065>.
- [301] S. Kempe, NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program, *Nucleic Acids Research.* 33 (2005) 5308–5319. <https://doi.org/10.1093/nar/gki836>.

- [302] E.K.W. Sim, S. Muskawad, C.-S. Lim, J.H. Yeo, K. Hiang Lim, R.T. Grignani, A. Durrani, G. Lau, C. Duran, Comparison of human and porcine aortic valves, *Clin. Anat.* 16 (2003) 193–196. <https://doi.org/10.1002/ca.10149>.
- [303] A. Milano, U. Bortolotti, E. Talenti, C. Valfrè, E. Arbustini, M. Valente, A. Mazzucco, V. Gallucci, G. Thiene, Calcific degeneration as the main cause of porcine bioprosthetic valve failure, *Am J Cardiol.* 53 (1984) 1066–1070. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(84\)90638-6](https://doi.org/10.1016/0002-9149(84)90638-6).
- [304] W.J. Mako, A. Shah, I. Vesely, Mineralization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valve cusps in the subcutaneous rat model: analysis of variations in implant site and cuspal quadrants, *J Biomed Mater Res.* 45 (1999) 209–213. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19990605\)45:3<209::aid-jbm8>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19990605)45:3<209::aid-jbm8>3.0.co;2-n).
- [305] N. Vyavahare, D. Hirsch, E. Lerner, J.Z. Baskin, F.J. Schoen, R. Bianco, H.S. Kruth, R. Zand, R.J. Levy, Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation. Efficacy and mechanisms, *Circulation.* 95 (1997) 479–488. <https://doi.org/10.1161/01.cir.95.2.479>.
- [306] O. Schussler, M. Shen, L. Shen, S.M. Carpentier, S. Kaveri, A. Carpentier, Effect of human immunoglobulins on the immunogenicity of porcine bioprostheses, *Ann Thorac Surg.* 71 (2001) S396-400. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(01\)02523-1](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(01)02523-1).

RESUME

L'inflammation joue un rôle critique dans les mécanismes de calcification de la valve aortique. Dans ce travail, nous montrons que la calcification des cellules interstitielles de valves aortiques humaines (hVICS) en culture est significativement amplifiée par l'ajout d'IL-8 ou de sérum de patients atteints de rétrécissement aortique calcifié (RAC) et que cet effet est prévenu en bloquant pharmacologiquement les récepteurs CXCR1/2. L'effet procalcifiant de l'IL-8 est associé à une augmentation de la dégradation de l'élastine et impliquerait la voie de signalisation NFkB et l'expression de la métalloprotéase MMP12. Ces résultats sont renforcés par l'observation que les valves aortiques de patients atteints de RAC montrent une surexpression de CXCR1/2 et MMP12 et une dégradation de l'élastine dans les zones calcifiées par rapport aux zones non calcifiées. Par ailleurs, dans un modèle de calcification de valves de porc implantées en sous-cutané chez le rat, nous montrons un effet préventif du blocage pharmacologique de CXCR1/2. L'IL-8 pourrait exercer un effet procalcifiant de façon directe sur les hVICs ou indirecte en limitant l'infiltration leucocytaire.

Mots clés : Cellules Interstitielles Valvulaires, Rétrécissement Aortique Calcifié, Interleukine-8, CXCR1/2, Inflammation.

ABSTRACT

Inflammation plays a critical role in the mechanisms of aortic valve calcification. In this work, we show that the calcification of human aortic valve interstitial cells (hVICS) in culture is significantly amplified by the addition of IL-8 or sera from patients with calcific aortic valve stenosis (CAVS) and that this effect is prevented by pharmacologically blocking CXCR1/2 receptors. The procalcifying effect of IL-8 is associated with an increase in the degradation of elastin and would involve the NFkB signaling pathway and the expression of the metalloprotease MMP12. These results are reinforced by the observation that the aortic valves of patients with CAVS show an overexpression of CXCR1/2 and MMP12 and a degradation of elastin in the calcified areas compared to the non-calcified areas. Moreover, in a model of calcification of pig valves implanted subcutaneously in rats, we show a preventive effect of the pharmacological blockade of CXCR1/2. IL-8 could exert a procalcifying effect directly on hVICs or indirectly by limiting leukocyte infiltration.

Key words : Interstitial Valve Cells, Aortic Valve Stenosis, Interleukin-8, CXCR1/2, Inflammation.