



HAL
open science

Impacte de l'inhibition de l'activité phosphatase de l'époxyde hydrolase soluble dans les calcifications cardiovasculaires.

Hind Boutheina Messaoudi

► **To cite this version:**

Hind Boutheina Messaoudi. Impacte de l'inhibition de l'activité phosphatase de l'époxyde hydrolase soluble dans les calcifications cardiovasculaires.. Santé. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR051 . tel-04396988

HAL Id: tel-04396988

<https://theses.hal.science/tel-04396988v1>

Submitted on 16 Jan 2024

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

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Impacte de l'inhibition de l'activité phosphatase de l'époxyde hydrolase soluble dans les calcifications cardiovasculaires.

**Présentée et soutenue par
HIND BOUTHEINA MESSAOUDI**

**Thèse soutenue le 19/12/2023
devant le jury composé de**

MME GIUSEPPINA CALIGIURI	Directeur de Recherche, UNIVERSITE PARIS 7 PARIS DIDEROT	Rapporteur du jury
M. FREDERIC JAISSE	Directeur de Recherche, SORBONNE UNIVERSITE	Rapporteur du jury
M. ROMAIN CAPOULADE	Chargé de Recherche, UNIVERSITE NANTES	Membre du jury
MME LUCIE HENAUT	Ingénieur de Recherche, UNIVERSITE AMIENS PICARDIE JULES VERNE	Membre du jury
MME MARGAUX VAN WYNSBERGHE	, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. JEREMY BELLIE	Professeur des Univ - Prat Hospitalier, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par JEREMY BELLIE (ENDOTHELIUM, VALVULOPATHIES ET INSUFFISANCE CARDIAQUE)

Remerciement

L'achèvement de ce travail, réalisé au cours de quatre années, suscite une satisfaction profonde. C'est le moment propice pour se remémorer les personnes qui ont rendu possible son aboutissement.

Je souhaite exprimer ma sincère reconnaissance envers **Madame Giuseppina CALIGIURI**, directrice de recherche à la Sorbonne université. C'est avec un profond sentiment d'honneur que je la remercie d'avoir accepté d'être rapporteur et juger mon travail. Ses remarques judicieuses ont considérablement contribué à l'amélioration de la qualité de ce manuscrit. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de participer à ce jury.

J'exprime également ma gratitude envers **Monsieur Frédéric JAISSER**, directeur de recherche à l'université de Paris Diderot. Sa disponibilité en tant que rapporteur de mes travaux et ses observations éclairantes ont grandement contribué à l'amélioration de la qualité de ce manuscrit. Je souhaite également le remercier pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de faire partie de ce jury.

J'exprime également ma reconnaissance envers **Madame Margaux VAN WYNSBERGHE**, pour sa minutie dans l'examen de ce mémoire. Je tiens à la remercier chaleureusement pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de faire partie de ce jury.

J'exprime ma gratitude envers **Madame Lucie HENAUT** pour ses remarques avisées et sa franchise qui m'ont été d'une grande valeur et pour sa participation à ce jury.

J'exprime également ma gratitude à **Monsieur Romain CAPOULADE** pour ses conseils judicieux et l'honneur qu'il me fait en acceptant de faire partie de ce jury.

Je souhaite exprimer ma gratitude sincère envers **Monsieur Jérémy BELLIEN**, Professeur à l'université de Rouen Normandie et directeur de laboratoire U1096 pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je le remercie pour avoir dirigé mes travaux de recherche, pour sa confiance qu'il m'a accordé tout au long de ces années et pour ses précieux conseils ainsi que ses remarques constructives. Son accompagnement a été particulièrement enrichissant, tant sur le plan humain que professionnel.

Je souhaite particulièrement remercier **Monsieur Nicolas PERZO** pour son implication dans ce travail, sa disponibilité et sa confiance. Ces quelques lignes ne m'offrent pas suffisamment de place pour te témoigner ma gratitude envers ton engagement.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude envers tous mes amis et collègues de l'équipe U1096 pour leur assistance précieuse, leur soutien constant et leur amabilité. Je tiens également à les remercier pour la confiance qu'ils m'ont accordée en me permettant de m'impliquer activement dans la vie collective de l'équipe. Les relations humaines que j'ai cultivées à leurs côtés ont engendré de véritables liens d'amitié qui, à mes yeux, sont inestimables. Je tiens particulièrement à exprimer ma reconnaissance envers **Khedi, Sylvanie, Saida, Anaïs, Tony et Manon**, pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée. Mes remerciements s'étendent également à mes co-thésards et anciens collègues du bureau (**Coraline, Yohan, Coralie, Manon, Eva, Léa et Théo**) pour tous les moments agréables passés ensemble.

Je ne veux pas oublier une personne qui a toujours su m'apporter de l'aide depuis mon arrivé au laboratoire, **Monsieur Matthieu LEUILLIER**.

Je tiens à remercier **Monsieur Sylvain FRAINEAU et Monsieur Eric DURANC** pour leurs participations aux réunions autour du projet et leurs indispensables conseils qui m'ont été utiles pour l'avancée de mes travaux.

Ebba, Paul et Antoine, Je vous exprime ma gratitude pour avoir et partagé, à travers vos enseignements, cette passion qui nous anime. Les années passées au laboratoire m'ont permis d'admirer votre ténacité, votre dévouement et votre engagement professionnel. Mes remerciements s'étendent pour les précieux conseils prodigués, les échanges scientifiques, et bien au-delà, pour les discussions enrichissantes.

Je souhaite remercier **Monsieur Youssef BENNIS** pour son écoute et ses conseils qui ont été utiles pour l'avancée du travail.

Evidemment, je tiens à remercier **Thomas et Guillaume** de m'avoir transmis leur savoir théorique et technique, de m'avoir toujours aidé et conseillé.

Je ne veux pas oublier **Monsieur Eugen PROSCHAK** et les membres de l'institut de chimie pharmaceutique à Francfort, et particulièrement **Steffen, Felix et Johanna**, qui m'ont apporté une aide précieuse au fil des deux mois de stages.

Je souhaite également exprimer ma gratitude envers toutes les personnes en dehors du milieu universitaire (**Inès, Najwa, Maya, Saleh, Clémence, Misa, Maria, Germain, Aylene, Nour, Sahar, Elie et David**) qui, chacune à leur manière, ont apporté leur soutien.

Mes remerciements les plus sincères vont à mes chers parents (**Kheira et Liamine**) qui ont su croire en moi et ont offert toute leur assistance lorsque j'en avais besoin. Ce mémoire leur est dédiée à 200%. La réalisation de ce mémoire est le fruit non seulement de mes efforts, mais aussi de leur soutien indéfectible qui a rendu ce chemin plus significatif et moins solitaire. Merci du fond du cœur pour votre amour et votre encouragement.

J'exprime également ma reconnaissance envers toute ma famille, dont les membres, toujours plus nombreux, ont contribué, de près ou de loin, à forger la personne que je suis devenue. Je tiens également à exprimer ma gratitude à mes frères et sœurs (**Aya, Hakim, Khalil, Nesrine, Ali, Bob et Didou**) pour leur présence, leur encouragement constant et de leur soutien inconditionnel qui m'ont été une source inestimable de force et de motivation.

Ton soutien moral, tes encouragements constants et ta patience infinie ont été une source d'inspiration quotidienne. Ta capacité à comprendre les défis auxquels j'ai été confrontée et à partager avec moi les hauts et les bas de ce parcours (mais pas que...) ont été d'une importance cruciale. Merci infiniment pour être mon partenaire de vie et mon soutien infaillible **Taha**.

Merci à toutes et à tous.

Sommaire

<i>Liste des figures</i>	11
<i>Liste des tableaux</i>	13
<i>Liste des abréviations</i>	14
<i>Résumé</i>	21
<i>Abstract</i>	23
<i>Synthèse bibliographique</i>	25
<i>Introduction</i>	26
<i>Chapitre I – Les calcifications vasculaires</i>	27
1. Définition et épidémiologie	28
1.1. Composition de la paroi artérielle	29
1.1.1. L’intima	29
1.1.2. La média	30
1.1.3. L’adventice	30
1.2. La calcification artérielle de l’intima : athérosclérotique	31
1.3. La calciphylaxie : artériolopathie urémique calcifiante	32
1.4. La calcification artérielle de la média : médiacalcosé	32
2. Facteurs de risque des calcifications vasculaires	33
2.1. Les facteurs de risque traditionnels	34
2.2. Les facteurs de risque spécifiques à l’IRC	34
3. Les acteurs de la calcification	34
3.1. Le phosphate inorganique (Pi)	34
3.2. Le facteur de croissance des fibroblastes FGF-23	36
3.3. La parathormone (PTH)	37
3.4. Le calcium	38
3.5. L’ostéopontine	38
3.6. L’ostéoprotégérine	39
3.7. La fétuine A	39
3.8. La Matrix GLA protein (MGP)	40
3.9. Le pyrophosphate inorganique (PPi)	41
3.9.1. L’homéostasie du phosphate	42
3.10. La phosphatase alcaline tissu non spécifique (TNAP)	43

3.11.	La dégradation de l'élastine	44
4.	La pathogenèse de la calcification vasculaire	44
5.	La transdifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires.....	45
6.	L'évaluation de la calcification artérielle	47
7.	Stratégies thérapeutiques potentielles	47
7.1.	eNPP1 recombinant	47
7.2.	Les bisphosphonates	48
7.3.	La vitamine K	48
7.4.	L'administration exogène du PPI	50
7.5.	Les inhibiteurs de la TNAP	50
8.	La pathologie rénale calcifiante	51
8.1.	L'insuffisance rénale chronique (IRC)	51
8.2.	La calcification artérielle de l'IRC.....	52
8.3.	Les mécanismes de la calcification vasculaire lors de l'IRC.....	53
8.4.	Toxines urémiques	54
8.5.	Le PPI et l'insuffisance rénale chronique	57
9.	La rigidité artérielle et la calcification vasculaire	57
10.	Modèles de calcification artérielle médiale	58
10.1.	Modèles de calcification <i>in vitro</i>	58
10.2.	Modèles de calcification vasculaire <i>ex vivo</i>	59
10.3.	Modèles de calcification vasculaire <i>in vivo</i> non liés à l'IRC	59
10.3.1.	Souris déficientes en MGP	59
10.3.2.	Rats warfarine/vitamine K	60
10.3.3.	Rats vitamine D3/nicotine.....	60
10.3.4.	Rats âgés.....	61
10.4.	Modèles de calcification vasculaire <i>in vivo</i> liés à l'IRC	61
10.4.1.	Modèle de rat adénine.....	62
10.4.2.	Modèle de néphrectomie des 5/6ème	62
10.4.3.	Modèle d'électrocautérisation/coagulation de souris	63
10.4.4.	Autres modèles	63
<i>Chapitre II – Le rétrécissement aortique calcifié</i>		65
1.	Histologie de la valve aortique	66
1.1.	La situation anatomique de la valve aortique	66
1.2.	La valve aortique	67

1.3.	La valvulogenèse	68
1.4.	Structure histologique	71
1.4.1.	L'endothélium	72
1.4.2.	La ventricularis	72
1.4.3.	La spongiosa	73
1.4.4.	La fibrosa	73
2.	Les différents types cellulaires composant la valve aortique	74
2.1.	Les cellules valvulaires endothéliales (VECs)	74
2.2.	Les cellules valvulaires interstitielles (VICs)	75
2.2.1.	Les VICs progénitrices (pVICs)	76
2.2.2.	Les VICs quiescentes (qVICs)	76
2.2.3.	2.2.3. Les VICs activées (aVICs)	76
2.4.4.	Les VICs ostéoblastiques (obVICs)	77
2.3.	La physiologie de la valve aortique	78
2.3.	Environnement hémodynamique	78
3.	Epidémiologie et étiologie du rétrécissement aortique	79
3.4.	Le rétrécissement aortique d'origine dégénérative	80
3.5.	La bicuspidie congénitale	80
3.6.	Le rétrécissement aortique d'origine rhumatismal	80
3.7.	Le RAC et l'insuffisance rénale chronique (IRC)	81
4.	Les facteurs de risque du RAC	81
5.	Généralités et développement du RAC	82
6.	Diagnostic du RAC	83
6.4.	Signes cliniques	83
6.4.4.	L'angor	84
6.4.5.	La dyspnée	84
6.4.6.	La lipothymie	84
6.5.	Exploration échocardiographie	84
6.5.4.	La surface valvulaire aortique	85
6.5.5.	Le pic de vitesse (AoVmax)	85
6.5.6.	Le gradient moyen transvalvulaire	85
6.5.7.	Autres manifestations échocardiographiques	86

6.6.	Physiopathologie	86
7.	Mécanismes physiopathologiques	87
7.1.	Inflammation	87
7.2.	Fibrose et remaniement de la MEC	89
7.3.	Néo-angiogenèse.....	90
7.4.	Calcifications	90
7.5.	Les voies moléculaires calcifiantes	93
8.	La prise en charge du RAC.....	94
8.1.	Le remplacement valvulaire	94
8.1.1.	Le remplacement valvulaire aortique RVA	95
8.1.2.	Le traitement percutané du rétrécissement aortique « TAVI ».....	95
8.2.	Les approches pharmacologiques	95
8.2.1.	Les statines	96
8.2.2.	Les inhibiteurs de l'ECA	96
8.2.3.	Essais cliniques en cours	96
9.	Modèles <i>in vivo</i> du RAC	98
9.1.	Modèles de souris du RAC	98
9.2.	Modèle de lapins du RAC	99
9.5.1.	Modèles de RAC induit par un régime alimentaire chez le lapin	100
9.5.2.	Modèles génétiques de RAC chez le lapin	101
9.6.	Modèle porcins.....	101
9.6.1.	Modèles porcins de RAC induit par l'alimentation	102
9.6.2.	Modèles génétiques porcins de RAC	103
9.7.	Autres modèles animaux	103
10.	L'atteinte cardiaque au cours du RAC	104
10.1.	L'hypertrophie ventriculaire gauche au cours du RAC	104
10.2.	La progression de l'hypertrophie vers l'insuffisance cardiaque	105
10.3.	L'apoptose des myocytes	107
10.4.	La fibrose	107
<i>Chapitre III – L'activité phosphatase de l'époxyde hydrolase soluble et les calcifications</i>		
<i>cardiovasculaires</i>		
1.	Les époxydes hydrolases	110
2.	L'époxyde hydrolase microsomale (mEH)	111
3.	L'époxyde hydrolase soluble.....	111

4.	Régulation de l'activité de la sEH.....	112
5.	L'activité sEH hydrolase (sEH-H).....	113
5.1.	Les substrats de la sEH-H.....	114
5.1.1.	Les acides époxyoctadécamonoénoïques (EpOMEs).....	114
5.1.2.	Les acides époxyeicosatétraénoïques (EEQs).....	115
5.1.3.	Les acides époxydocosapentaénoïques (EDPs).....	115
5.1.4.	Les acides époxyeicosatriénoïque (EETs).....	116
5.2.	Les inhibiteurs de l'activité sEH-H.....	117
5.3.	Impact de l'inhibition de l'activité sEH-H au cours de la calcification vasculaire.....	118
6.	L'activité sEH phosphatase (sEH-P).....	119
6.1.	Les substrats de la sEH-P.....	120
6.1.1.	Sphingosine-1-phosphate (SP1).....	121
6.1.2.	Les isoprénoïdes pyrophosphates.....	121
6.1.3.	Les acides lysophosphatidiques (LPAs).....	122
6.2.	Les inhibiteurs de la sEH-P.....	123
7.	Rôle physiologique de la sEH-P.....	124
8.	Les polymorphismes du gène <i>EPHX2</i> et le lien avec les maladies cardiovasculaires.....	127
	<i>Objectifs de la thèse</i>	130
	<i>Matériel et Méthodes</i>	134
1.	Culture cellulaire.....	135
2.	Modèles animaux expérimentaux.....	135
2.1.	Expérimentation animale.....	135
2.2.	Génération des rats knock-in pour l'activité sEH-P.....	135
2.3.	Génotypage des animaux.....	136
2.4.	Modèle d'insuffisance rénale chronique : néphrectomie des 5/6ème.....	136
2.5.	Supplémentation en phosphore et en calcium.....	137
3.	Etude de la fonction et de la structure cardiaques.....	137
3.1.	Echocardiographie transthoracique.....	137
3.2.	Evaluation de la fibrose cardiaque.....	138
4.	Evaluations valvulaires aortiques.....	139
4.1.	Mesures échocardiographiques.....	139
4.2.	Histologie et immunohistochimie.....	139
5.	Evaluation de la fonction rénale.....	141
5.1.	Mesure du débit de filtration glomérulaire.....	141

5.2.	Histologie rénale	141
5.3.	Dosages plasmatiques	141
5.4.	Cages métaboliques et dosages urinaires	142
6.	Evaluation de la fonction endothéliale et de la pression artérielle	142
6.1.	Mesure de la dilatation endothélium-dépendante.....	142
6.2.	Mesure de la pression artérielle	142
7.	Dosage du calcium direct : méthode o-crésolphthaléine	143
8.	Les inhibiteurs pharmacologiques	143
9.	RT- QPCR quantitative	144
9.1.	L'extraction d'ARNs totaux	144
9.2.	Le traitement à la DNase	144
9.3.	Transcription inverse	145
9.4.	PCR quantitative	145
10.	Analyses statistiques.....	146
	<i>Résultats et discussion</i>	147
	<i>Étude 1</i>	148
	<i>Étude 2</i>	195
	<i>Étude 3</i>	210
1.	Expression du gène de la sEH dans les hVICs.....	212
2.	Quantification du calcium dans les hVICs issues de valves calcifiées : impact de l'inhibition pharmacologique de la sEH-P	212
3.	Quantification du calcium dans les valves de rats : impact de l'inhibition génétique de la sEH-P	213
4.	Modèle <i>in vivo</i> de calcification de la valve aortique : impact de l'inhibition génétique de l'activité de la sEH-P	214
4.1.	Poids corporel et mortalité	214
4.2.	Atteinte rénale	215
4.3.	Calcification de la valve aortique et répercussions hémodynamiques	216
4.4.	Fonction cardiaque.....	218
4.4.	Fonction vasculaire et pression artérielle.....	219
	<i>Discussion</i>	221
	<i>Conclusion et perspectives</i>	227
	<i>Valorisation scientifique</i>	230
	<i>Références bibliographiques</i>	233

Liste des figures

Figure 1 : Les principales causes de mortalité dans le monde	28
Figure 2 : Schéma représentant la structure de la paroi vasculaire	29
Figure 3 : Classes des calcifications cardiovasculaires	31
Figure 4 : Les calcifications intimaux et médiales	33
Figure 5 : Régulation de la minéralisation des cellules musculaires lisses vasculaires par le Pi	36
Figure 6 : Représentation schématique des transporteurs et des ectoenzymes impliqués dans le métabolisme du pyrophosphate inorganique extracellulaire	40
Figure 7 : Régulation de la phosphatémie sous la dépendance de l'os, des reins et de l'intestin en physiologie et au cours de la maladie rénale.	43
Figure 8 : La classification de l'IRC par stade en fonction du DFG	52
Figure 9 : L'effet de l'IS sur la fonction endothéliale et l'athérosclérose	56
Figure 10 : Le cœur et les valves cardiaques	66
Figure 11 : Anatomie des valves cardiaques	68
Figure 12 : Représentation schématique de la morphogénèse cardiaque	69
Figure 13 : Transition endothélio-mésenchymateuse	70
Figure 14 : Maturation de la valve aortique	70
Figure 15 : les différentes couches de la valve aortique	74
Figure 16 : Représentation schématique des principaux mécanismes physiopathologiques du RAC	88
Figure 17 : Colocalisation des dépôts lipidiques (LDL oxydés) et des cellules inflammatoires	91
Figure 19 : Le développement et la décompensation ultérieure de l'hypertrophie du VG en réponse à la sténose aortique	106
Figure 20 : Structure cristalline d'un homodimère de la sEH humaine	112
Figure 21 : les acides gras époxydés métabolisés par l'activité sEH	114
Figure 22 : Structure chimique des inhibiteurs de la sEH	118
Figure 23 : Substrats endogènes de la sEH-P	121
Figure 24 : Les inhibiteurs de l'activité phosphatase de la sEH	124

Figure 25 : Mécanisme illustrant le rôle de l'activité sEH-P dans la régulation de l'activation de l'eNOS induite par la simvastatine et la production du NO dans la cellule endothéliale	126
Figure 26: Niveau d'expression génique de la sEH dans les hVICs.....	212
Figure 27 : Quantification de la concentration en calcium dans les hVICs.....	213
Figure 28 : Quantification de la concentration en calcium ex vivo dans des valves murines	214
Figure 29 : Suivi du poids corporel et de la survie	215
Figure 30 : Evaluation de la fonction rénale et des paramètres biochimiques	216
Figure 31 : Evaluation de la fonction valvulaire aortique et de l'inflammation.....	217
Figure 32 : Évaluation de la fonction ventriculaire gauche	218
Figure 33 : Évaluation de la fonction vasculaire	219

Liste des tableaux

Tableau 1 : Localisation et substrats lipidiques des époxydes hydrolases.....	110
Tableau 2 : Molécules pharmacologiques utilisées.....	143

Liste des abréviations

1,25(OH)2D3 : Vitamine D3

ABCA1 : ATP binding cassette A1

ABCG1 : ATP binding cassette G1 ADN acide désoxyribonucléique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADP : Adenosine diphosphate

AEPU : 1-adamantanyl-3-(5-(2-(2-éthoxyethoxy)pentyl) urée

AFC : N-Acetyl-S-farnesyl-L-cysteine

AHBA : Acide amino-hydroxybenzoïque

Akt : Protéine kinase B

AMP : Adenosine monophosphate

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

AMPK : AMP-activated protein kinase

ANK : Ankylose progressive ou ANKH

AoGmoy : Gradient de pression transvalvulaire aortique moyen

AoVmax : Vitesse maximale transvalvulaire aortique

ApoB : Apolipoprotéine B

APOE : Apolipoprotéine E

ApoE : Apolipoprotéine E

Arg : Arginine

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

AS : Aortic stenosis

aSMA : Alpha-smooth muscle cell

Asp : Asparagine

ATP : Adénosine triphosphate

AttoPhos : Phosphate de 2'-[2-benzothiazoyl]-6'-hydroxybenzothiazole

ATX : Autotaxine

AUDA : Acide N-adalantanyle-N'-dodécanoïque uréique
AVC : Accident vasculaire cérébral
aVIC : VIC activée
BMP-2 : Bone morphogenic protein 2
BP : Bisphosphonates
BSA : Bovine serum albumin
CaSR : Récepteur sensible au calcium
Cbfa1 : Core-binding factor subunit alpha-1
CD40 : Cluster de differentiation 40
CD68 : Cluster de differentiation 68
CD73 : Cluster de differentiation 73
CMLV : Cellule musculaire lisse vasculaire
COX : Cyclooxygénases
CRP : C-réactive protéine
CYP2C29 : Cytochrome 2C29
Cys : Cystéine
DAG : Diacylglycerol
DFG : débit de filtration estimé
DHA : Acide docosahexaénoïque
DHEQ : Acides dihydroxyeicotétraénoïques
DHETs : Acides dihydroxyeicosatriénoïques
DiHDPA : Acides dihydroxydocosapentaénoïques
DiHOMEs : Acides dihydroxyoctadécaénoïques
ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine
EEQs/ EpETE : Acides époxyeicosatétraénoïques
EETs : Acides époxyeicosatriénoïques
EH : Epoxyde hydrolase
EMT : Transition endothélio-mésenchymateuse
EMT : Endothéliomésenchymateuse
eNOS : Oxyde nitrique synthase endothéliale

eNPP : Ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase
EPA : Acide eicosapentaénoïque
EpDPA/ EDP : Acides époxydocosapentaénoïques
EpOMES : Acides époxyoctadécamonoénoïques
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
FE : Fraction d'éjection
FEVG : Fraction d'éjection du VG
FGF-2 : Facteur de croissance des fibroblastes 2
FGF-23 : Facteur de croissance des fibroblastes 23
FGFR : Récepteur de facteur de croissance des fibroblastes
FPP : Farnésyl-pyrophosphate
GAG : Glycosaminoglycane
GGPP : Géranylgeranyl-pyrophosphate
Gln : Glutamine
GPP : Géranyl-pyrophosphate
H&E : Coloration hématoxyline-éosine
HDL : Lipoprotéines de haute densité
HETEs : Acides hydroxyeicosatétraénoïques
HFD : High fat diet
His : Histidine
HUVEC : Cellule endothéliale du cordon ombilical humain
ICAM -1 : Molécule d'adhésion intercellulaire soluble-1
IEC : Inhibiteur de l'ECA
IL : Interleukine
IL-6 : Interleukine 6
IP3 : Inositol (1,4,5) triphosphate
IRC : Insuffisance rénale chronique
IS : Indoxyl sulfate
JHEH : Epoxde hydrolase hormone juvénile
JNK : c-Jun N- terminal kinas

KI : Knock-in
KI-sEH-P : Rats Knock In pour l'activité phosphatase de la sEH
LDL : Lipoprotéines de basse densité
LDLR : Récepteur des lipoprotéines de basse densité
LOX : Lipooxygénases
Lp(a) : Lipoprotéine(a)
LPA : Acide lysophosphatidique
LPAR1 : Récepteur de type 1 à l'acide lysophosphatidyle
LPC : Lysophosphatidylcholine
LPC : Lysophosphatidylcholine
LPL : Lysophospholipides
LPS : Lysophosphatidylsérine
LTA4 : Leucotriène A4
Lys : Lysine
MAG : Monoacylglycérol
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1
MEC : Matrice extracellulaire
mEH : Epoxyde hydrolase microsomale
Mg²⁺ : Ion magnésium
MGP : Matrix GLA protéine
MK : Ménaquinone
MMP : Métalloprotéase matricielle
Msx2 : Msh Homeobox 2
NF-κB : Nuclear factor-kappa B
NICD : Notch intracellular domain
NKCC2 : Cotransporteur Na⁺- K⁺- 2Cl⁻
NO : Monoxyde d'azote
NOS : Nitric oxide synthase

NOTCH1 : Protéine 1 homologue neurogène du locus notch
NZWR : New Zealand white rabbit
obVIC : VIC ostéoblastique
OPG : Ostéopentégérine
OPGL : Ligand de l'ostéopentégérine
OPN : Ostéopontine
oxLDL : Lipoprotéine de basse densité oxydée
oxPL : Phospholipide oxydé
PAL : Phosphatase alcaline
PAS : Pression artérielle systolique
PBS : Phosphate buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction
PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PFA : Paraformaldéhyde
Pi : Phosphate inorganique
PIP2 : Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PLA : Phospholipases A
PLA1 : Phospholipase A1
PLA2 : Phospholipase A2
PLC : Phospholipase C
PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptors gamma
PPi : Pyrophosphate inorganique
PTH : Hormone parathyroïdienne
pVIC : VIC progénitrice
qVIC : VIC quiescente
RAC : Rétrécissement aortique calcifié
RANK : Activateur du récepteur de facteur de transcription nucléaire kappa B
RBP : Recombining binding protein

RANKL : Ligand RANK

RhoA : Ras homolog family member A

Runx2 : Runt-related transcription factor 2

RVA : Remplacement valvulaire aortique

SDT : spontanément diabétique

sEH : Epoxyde hydrolase soluble

sEH-H : Activité hydrolase de la sEH

sEH-P : Activité phosphatase de la sEH

SHR : Rat spontanément hypertendu

SMMHC : smooth muscle myosin heavy chain

SNP : Single-nucleotide polymorphism

Sox9 : SRY-box 9

SP1 : Spingosine-1-phosphate

SPHK1/ SPHK2 : Sphingosine kinase 1 et 2

SVF : Sérum de veau foetal

SWE101 : L'acide 4-(4-(3,4-dichlorophényle -5-phényloxazole-2-yl) butanoïque

t-AUCB : Acide trans-4[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy]-benzoïque

TAVI : Transcatheter aortic valve implantation

TGF- β : Transforming growth factor beta

TIMP : Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases

TNAP : Phosphatase alcaline tissulaire non spécifique

TNFR1/2 : Tumor necrosis factor receptor

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

TPPU : 1-trifluorométhoxyphenyl-3-(1-propionylpipéridin-4-yl) urée

TRP : Canaux ionotropiques à potentiel de récepteur transitoire

TRPC6 : Canal cationique potentiel de récepteur transitoire sous-famille C, membre 6

TRPV5 : Canal cationique potentiel de récepteur transitoire sous-famille V, membre 6

Tyr : Tyrosine

UTP : Uridine triphosphate

UTR : Untranslated transcribed region

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule 1

VDN : Vitamine D3 et nicotine

VEC : Cellule valvulaire endothéliale

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VEGF-R : Receptor Vmax Vitesse initiale maximale

VG : Ventricule gauche

VIC : Cellule valvulaire interstitielle

vW : Von Willebrand

WHH : Lapins hyperlipidémiques héréditaires Watanabe

WT : Wild-type

Résumé

Les calcifications cardiovasculaires, également appelées calcifications ectopiques, sont un phénomène pathologique très fréquent. Leur développement est étroitement associé au vieillissement, au diabète, à l'hypertension artérielle, à l'athérosclérose et à l'insuffisance rénale chronique. L'apparition et la progression de ces calcifications augmentent le risque d'évènements cardiovasculaires chez les patients. Il est désormais reconnu que les calcifications cardiovasculaires sont le résultat d'un processus actif conduisant à la formation de dépôts de cristaux d'hydroxyapatite, qui présente des similitudes avec le processus de minéralisation osseuse. Ces calcifications peuvent se développer dans la paroi vasculaire, notamment dans la média, où les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) se transforment en cellules ostéoblastiques, ainsi que dans la valve aortique, entraînant le développement d'un rétrécissement aortique calcifié (RAC). Malheureusement, à ce jour, aucun traitement pharmacologique ne s'avère efficace pour prévenir ou ralentir le développement des calcifications cardiovasculaires. Dans ce contexte, l'époxyde hydrolase soluble (sEH) pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique. La sEH, codée par le gène *EPHX2*, est une enzyme bifonctionnelle. Elle possède non seulement une activité époxyde hydrolase (sEH-H) dans son domaine C-terminal, mais présente également une activité lipidique phosphatase (sEH-P) dans son domaine N-terminal. Alors que de nombreuses études ont été menées sur l'activité sEH-H, conduisant au développement d'inhibiteurs pharmacologiques utilisés en clinique, peu d'informations sont actuellement disponibles concernant le rôle physiologique et pathologique de l'activité de la sEH-P. Bien qu'il ait été initialement démontré qu'elle contribue à la stabilisation de l'activité hydrolase ou à la dimérisation de l'enzyme, certaines données récentes indiquent que le sEH-P métabolise d'autres médiateurs lipidiques importants, tels que les acides lysophosphatidiques (LPAs) intracellulaires, qui sont impliqués dans un large éventail de fonctions biologiques telles que le tonus vasculaire et l'inflammation. En utilisant des approches *in vitro* sur des cellules humaines interstitielles valvulaires (VIC) et *ex vivo* sur des aortes et des valves de rat, le rôle du domaine sEH-P a été évalué dans les calcifications cardiovasculaires. Des études *in vivo* ont été réalisées en utilisant le modèle de rat transgénique knock-in pour la sEH-P (KI-sEH-P) afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de cette activité dans le développement des calcifications artérielles et le développement du RAC dans un modèle d'insuffisance rénale chronique chez le rat soumis à un régime normal ou riche en phosphate.

Les résultats de ces études ont montré que le sEH-P contribue au développement de la calcification vasculaire en dégradant l'inhibiteur de minéralisation, les anions pyrophosphates, dans les cellules endothéliales et en réduisant l'activation du PPAR γ médiée par les LPA. De plus, l'inhibition de la sEH-P a empêché la calcification de la valve aortique et ses conséquences hémodynamiques dans le modèle de rat néphrectomisé soumis à un régime riche en phosphate.

En conclusion, ce travail révèle que l'activité phosphatase de la sEH est un acteur clé dans le développement des calcifications cardiovasculaires, soulignant l'intérêt de développer des inhibiteurs pharmacologiques de la sEH-P actifs *in vivo* comme stratégie thérapeutique potentielle pour leur traitement et ainsi l'amélioration du pronostic des patients.

Mots clés : calcifications vasculaires, rétrécissement aortique calcifié, époxyde hydrolase soluble, insuffisance rénale chronique

Abstract

Cardiovascular calcifications, also known as ectopic calcifications, are a very common pathological phenomenon. Their development is closely associated with aging, diabetes, high blood pressure, atherosclerosis, and chronic kidney failure. The appearance and progression of these calcifications increases the risk of cardiovascular complications in patients. It is now recognized that cardiovascular calcifications are the result of an active process leading to the formation of hydroxyapatite crystal deposits, which has similarities to the process of bone mineralization. These calcifications can develop in the vessel wall, particularly in the media, where vascular smooth muscle cells (VSMCs) transform into osteoblastic cells, as well as in the aortic valve, leading to the development of aortic stenosis (AS). Unfortunately, to date, no effective pharmacological treatment is available to prevent or slow the development of cardiovascular calcifications. In this context, soluble epoxide hydrolase (sEH) could constitute a new therapeutic target. sEH, encoded by the *EPHX2* gene, is a bifunctional enzyme. It not only possesses an epoxide hydrolase activity (sEH-H) in its C-terminal domain, but also exhibits a lipid phosphatase activity (sEH-P) in its N-terminal domain. While numerous studies have been conducted on sEH-H activity, even leading to the clinical development of pharmacological inhibitors, little information is currently available regarding the physiological and pathological role of the sEH-P activity. Although originally shown to contribute to the stabilization of hydrolase activity or dimerization of the enzyme, some recent data indicate that sEH-P metabolizes other important lipid mediators, such as intracellular lysophosphatidic acids (LPA), which are involved in a wide range of biological functions such as vascular tone and inflammation. Using *in vitro* approaches on valvular interstitial human cells (VICs) and *ex vivo* experiments on rat aortas and valves, the role of sEH-P domain in cardiovascular calcifications was assessed. Furthermore, to determine the impact of the deletion of the sEH-P activity, *in vivo* studies were carried out using the knock-in sEH-P transgenic rat model (KI-sEH-P). The latter, allowed evaluating the development of arterial calcifications and AS in a model of chronic renal failure in rats subjected to a normal diet or a diet rich in phosphate.

The results of this study showed that sEH-P contributes to the development of vascular calcification by the degradation of the mineralization inhibitor pyrophosphate anions in endothelial cells and by reducing LPA-mediated activation of PPAR γ . In addition, the

inhibition of sEH-P prevents aortic valve calcification and its hemodynamical consequences in nephrectomized rats fed with a high-phosphate diet.

Altogether, our study reveals that the phosphatase activity of sEH is a key player in the development of cardiovascular calcifications, highlighting the interest of developing pharmacological inhibitors of sEH-P as a potential therapeutic strategy for their treatment and thus for improving patient prognosis.

Keywords: vascular calcifications, aortic stenosis, soluble epoxide hydrolase, chronic renal failure

Synthèse bibliographique

Introduction

La calcification est un processus physico-chimique physiologique ou physiopathologique. Ce phénomène implique l'accumulation au sein d'un compartiment biologique de dépôts de particules de cristaux de phosphate et de calcium, principalement des cristaux d'hydroxyapatite. Bien que la calcification osseuse soit un processus normal permettant le durcissement des os durant la croissance, d'autres tissus peuvent subir une calcification et notamment au niveau du système cardiovasculaire (1). Ces calcifications, dites anormales ou ectopiques, sont regroupées en 4 classes, dont 3 présentes au niveau vasculaire et la dernière se développant au sein de la valve aortique. Bien que les calcifications vasculaires aient été longtemps considérées comme la conséquence d'un processus purement passif, il est aujourd'hui connu que l'initiation et la progression de ces calcifications découlent d'un processus actif. Ce processus, très semblable à celui de la minéralisation osseuse, met en jeu plusieurs voies moléculaires et cellulaires (2).

Chapitre I – Les calcifications vasculaires

1. Définition et épidémiologie

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de morbi-mortalité après les cancers dans les pays occidentaux. Elles sont à l'origine de 150000 décès par an en France (3). Selon l'organisation mondiale de la santé, en 2019, 31% de la mortalité mondiale totale seraient liés aux maladies cardiovasculaires (en particulier les cardiopathies et les accidents vasculaires cérébraux) (figure 1). Cliniquement, la présence des calcifications vasculaires participe à l'apparition des évènements cardiovasculaires. En effet, chez les sujets âgés de plus de 60 ans, on observe le développement de calcification à l'échelle artérielle. Ces dépôts calciques sont à l'origine d'altérations hémodynamiques et contribuent au remodelage vasculaire et à l'apparition d'une hypertension artérielle. Ceci peut s'accompagner d'une hypertrophie, d'une ischémie cardiaque et à terme évoluer vers une insuffisance cardiaque (4). D'après Budoff *et al*, il a été montré une corrélation entre le score calcique et le taux de survie chez les patients atteints de calcification artérielle coronarienne. De ce fait, l'étendue et la sévérité des calcifications vasculaires fournissent des informations supplémentaires dans la prédiction de la morbi-mortalité cardiovasculaire (5).

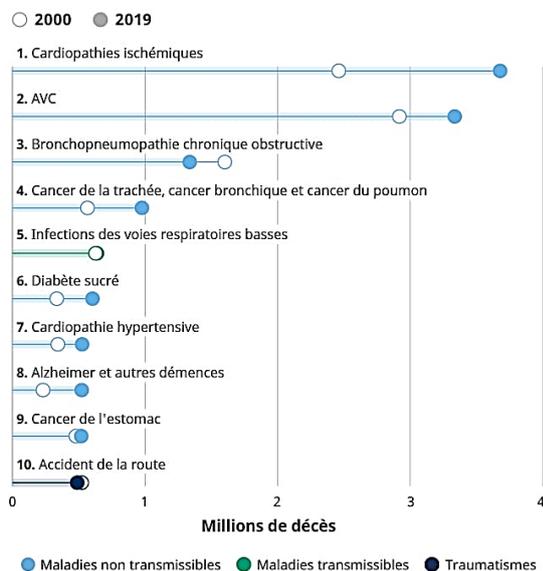


Figure 1 : Les principales causes de mortalité dans le monde

D'après (6).

1.1. Composition de la paroi artérielle

Au sein de l'artère, la calcification peut se produire au niveau des tuniques qui constituent le vaisseau. L'artère est essentiellement composée de trois feuillets qui sont de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la média et l'adventice (figure 2).

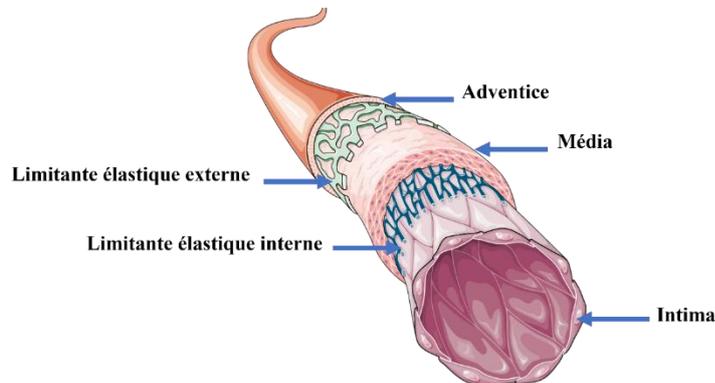


Figure 2 : Schéma représentant la structure de la paroi vasculaire

De l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la média et l'adventice. L'endothélium est la couche la plus interne, l'intima, composée de cellules endothéliales. Les cellules musculaires lisses vasculaires constituent la couche médiale. L'adventice est le feuillet le plus externe de l'artère. Les limitantes élastiques externes et internes séparent respectivement la média de l'adventice et de l'intima (Servier Medical Art).

1.1.1. L'intima

L'intima correspond à la tunique la plus interne et la moins épaisse de la paroi vasculaire. Ce feuillet interne rentre en contact direct avec la circulation sanguine et est tapissée uniquement par des cellules endothéliales formant ce qu'on appelle l'endothélium. Ce dernier joue un rôle clé dans la régulation du tonus vasomoteur (balance vasoconstriction/vasodilatation), l'agrégation plaquettaire, l'adhésion leucocytaire et l'inflammation. Les calcifications retrouvées au niveau de l'intima sont associées à l'athérosclérose et sont notamment présentes au sein de la plaque d'athérome (6,7).

1.1.2. La média

La média est la tunique moyenne la plus épaisse de la paroi du vaisseau sanguin. Elle se compose essentiellement de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) formant des couches appelées des unités lamellaires. Au sein de cette couche, les CMLVs baignent dans une matrice extracellulaire principalement composée de protéines élastiques et fibreuses (collagène et élastine). Elle est également limitée de part et d'autre par deux lames d'élastine appelées limitantes élastiques interne et externe. Grâce à ses composants, la fonction majeure de la média est d'assurer une force contractile et un support mécanique aux vaisseaux sanguins (9).

1.1.3. L'adventice

La couche située le plus à l'extérieur est l'adventice. Elle comporte principalement des éléments fibreux à savoir le collagène et l'élastine. L'adventice contient des vaisseaux de petit calibre appelés les *vasa vasorum* qui ont pour fonction d'assurer l'apport en oxygène et en nutriments essentiels. Comme précédemment mentionné, des calcifications pouvant se développer au niveau cardiovasculaire ont été démontrées en se basant sur des critères anatomiques, histologiques et étiologiques (figure 3) (10).

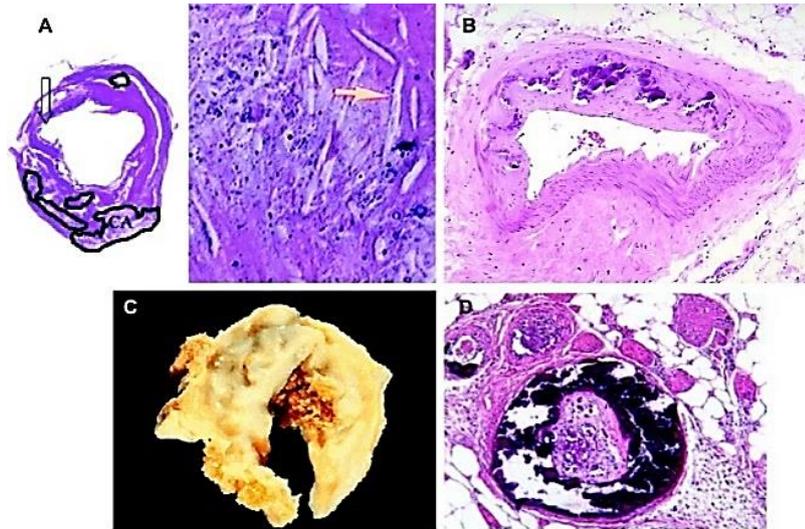


Figure 3 : Classes des calcifications cardiovasculaires

- A) *Illustration d'une calcification intinale athérosclérotique. En bas une plaque d'athérome rompue (colorée par l'hématoxyline/éosine, H&E) où des dépôts calciques sont présents. A côté et à fort grossissement, les dépôts lipidiques sont bien visibles (flèche). Les sphérules représentent les cristaux calciques. B) calcification de type médial, en couleur violet foncé sont indiqués les dépôts calciques artériels. C) représente une valve aortique bicuspidée très calcifiée. D) indique une calciphylaxie observée au sein d'un vaisseau sous cutané humain (10).*

Dans la partie suivante, nous allons aborder la différence entre les trois classes des calcifications vasculaires.

1.2. La calcification artérielle de l'intima : athérosclérotique

La calcification athérosclérotique impacte préférentiellement les artères de moyen et gros calibre et elle se développe au niveau des plaques d'athérome. Cette dernière est issue de l'accumulation de lipides, d'un infiltrat inflammatoire sous-endothélial et de l'invasion macrophagique. Les macrophages stimulent la prolifération et la migration des CMLVs de la média vers l'intima. En présence des facteurs pro inflammatoires (inflammation à bas grade associée à la présence des cytokines pro-inflammatoires et des lipoprotéines de basse densité (LDLs) oxydés), les CMLVs subissent une différenciation ostéogénique initiant la calcification.

1.3. La calciphylaxie : artériolopathie urémique calcifiante

Ce type de calcification impacte principalement les vaisseaux de la peau aboutissant à une diminution de la perfusion locale qui par la suite conduit à une nécrose tissulaire (11). Bien que les facteurs de risques soient connus, comme l'insuffisance rénale chronique (IRC) et le diabète par exemple, les mécanismes sous-jacents du développement de cette pathologie ne sont pas clairement établis (12).

1.4. La calcification artérielle de la média : médiacalcosé

La médiacalcosé est prédominante chez les patients atteints d'IRC. Elle touche préférentiellement la couche riche en élastine de la média du fait de la dégradation du réseau d'élastine artérielle. Cette perte d'élasticité des vaisseaux est à l'origine d'une rigidité artérielle qui se traduit fonctionnellement par une élévation de la pression artérielle systolique (PAS). La hausse de la PAS augmente la post-charge cardiaque participant au développement d'une hypertrophie ventriculaire gauche. Sur le plan cellulaire et moléculaire, la différenciation ostéogénique des CMLVs se déroule sous l'action de facteurs dits pro-ostéogéniques au premier rang desquels on retrouve le BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2), Msx2 (Msh Homeobox 2) et la phosphatase alcaline (PAL).

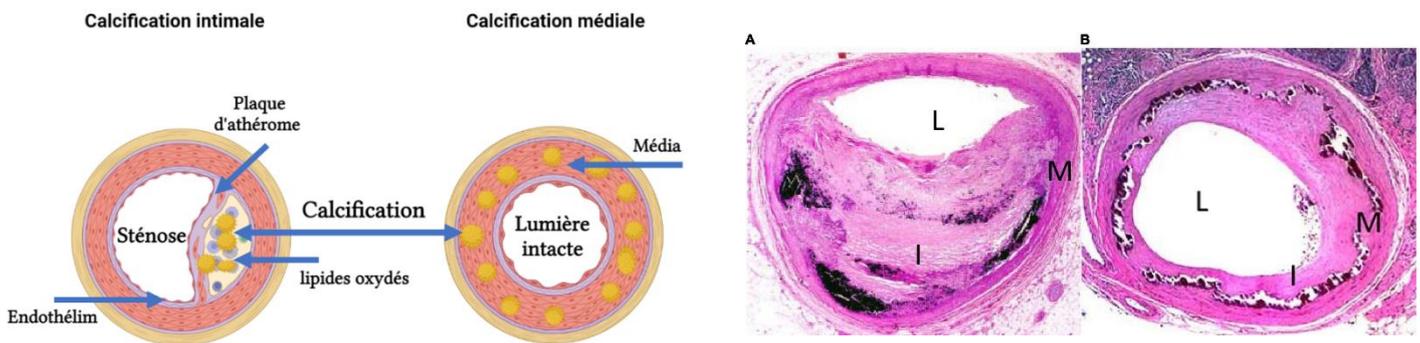


Figure 4 : Les calcifications intimales et médiales

A droite : Coloration H&E des artères tibiales d'un patient présentant une calcification intimale (A) et médiale (B). L : la lumière, I : l'intima, M : la média. A gauche : représentation schématique de la calcification intimale et médiale (13).

2. Facteurs de risque des calcifications vasculaires

Les facteurs de risques associés à la minéralisation vasculaire peuvent être regroupés en deux grandes classes : facteurs de risques traditionnels et non traditionnels.

Les complications cardiovasculaires liées au développement de l'IRC sont responsables d'au moins 50% de la mortalité chez ces patients (14). De ce taux de décès, 20% sont imputables à la pathologie coronarienne ischémique. Les répercussions cardiovasculaires et la mortalité élevée chez les patients atteints d'IRC sont fortement associées aux calcifications vasculaires (15). D'après Cianciolo *et al*, les facteurs de risque traditionnels seuls ne sont pas responsables de l'augmentation des complications cardiovasculaires mais d'autres altérations (notamment des processus inflammatoires et de l'homéostasie phosphocalcique) viennent se rajouter (16).

Ainsi les facteurs de risque de la maladie cardiovasculaire associés à l'IRC sont divisés en deux groupes : les facteurs de risque traditionnels et les facteurs de risque spécifiques à l'insuffisance rénale.

2.1. Les facteurs de risque traditionnels

Selon l'étude CHOICE (17), réalisée auprès de patients débutant leur dialyse, une grande partie des sujets présentent des facteurs de risque des complications cardiovasculaires tels que le diabète, un faible taux de lipoprotéine à haute densité (HDL), une hypertension artérielle systémique, une hypertrophie du ventricule gauche, un âge avancé, la sédentarité et le tabagisme.

2.2. Les facteurs de risque spécifiques à l'IRC

Ces facteurs sont issus de la défaillance rénale et peuvent aussi apparaître secondairement à un traitement utilisé pour ralentir/ suppléer cette perte de la fonction rénale (18). La dialyse et l'urémie sont intimement liées à la stimulation du stress oxydatif, la libération des cytokines, l'activation des facteurs pro-inflammatoires et l'augmentation de l'adhésion cellulaire menant tous au développement des calcifications vasculaires (19).

De surcroît, une longue durée en dialyse représente un facteur de risque pour la formation des calcifications coronariennes (20). Par ailleurs, les altérations du métabolisme phosphocalcique sont prédicteurs de l'apparition des événements cardiovasculaires et contribuent également à l'augmentation des décès d'origine cardiovasculaire chez les patients atteints d'IRC (21). Ces anomalies regroupent les produits phosphocalciques, l'hyperparathyroïdie secondaire, l'hypercalcémie et enfin le déficit en vitamine D.

3. Les acteurs de la calcification

3.1. Le phosphate inorganique (Pi)

Le Pi est majoritairement présent dans l'os (90%) sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite. Dans le milieu intracellulaire et extracellulaire, un faible pourcentage du Pi est retrouvé (1% et 9% respectivement). En effet, l'homéostasie du Pi dépend essentiellement de son absorption intestinale. A l'état physiologique rénal avec un débit de filtration

glomérulaire (DFG) > 45 ml/min, on note une élévation des taux sériques de calcium à l'inverse de ceux du Pi qui diminuent (22). Au cours de la baisse du DFG, le facteur de croissance des fibroblastes FGF-23 diminue la production de l'hormone parathyroïdienne (PTH). Ainsi, lorsque le DFG décroît, des mécanismes compensatoires se mettent en place afin de maintenir l'excrétion urinaire du Pi et permettant de réduire les taux sériques du Pi. En réponse à la chute du DFG, la production compensatoire de FGF-23 aboutit à la baisse de l'abondance des transporteurs du phosphate Npt 2a et Npt 2c au niveau des tubules proximaux rénaux diminuant la réabsorption du Pi (23). L'élévation des taux plasmatiques du Pi conduit à une hyperactivité des glandes parathyroïdiennes augmentant ainsi la production de la PTH. A son tour, la surproduction de la PTH aboutit au développement d'une hyperparathyroïdie secondaire. Lors de l'effondrement du DFG, les mécanismes compensatoires ne parviennent pas à maintenir l'excrétion du Pi. Ceci entraîne alors une augmentation des taux sériques du FGF-23, une hyperphosphatémie, une hypokaliémie (en raison de l'inhibition de la production de la vitamine D : 1,25-(OH) D₂). L'accumulation des toxines urémiques d'une part et la persistance de l'hyperparathyroïdie secondaire d'autre part stimulent le turnover osseux en libérant du calcium et du phosphate de l'os (24).

Rapporté par Cecillia *et al*, le Pi régule la calcification des CMLVs par l'intermédiaire de l'hyperphosphatémie et de l'augmentation de l'entrée de Pi à l'origine de l'augmentation intracellulaire des concentrations en Pi. Cette élévation du taux intracellulaire du Pi active différentes voies de signalisation responsables de l'augmentation de l'expression de gènes pro-ostéogéniques (figure 5). Bien que l'augmentation intracellulaire du Pi soit associée à l'acquisition d'un nouveau phénotype ostéogénique des CMLVs, elle entraîne aussi la perte d'expression de la signature fibroblastique. Ensemble, ces changements induits par le Pi, y compris le remodelage matriciel, la sécrétion des vésicules matricielles et les protéines liant le calcium, entraînent le développement de la calcification à l'intérieur des vaisseaux (25).

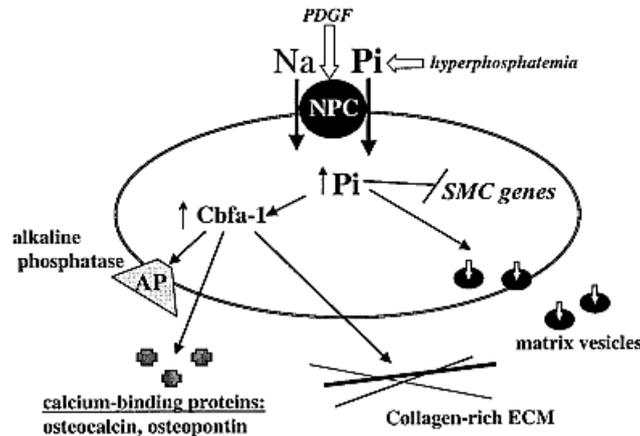


Figure 5 : Régulation de la minéralisation des cellules musculaires lisses vasculaires par le Pi

D'après (25).

3.2. Le facteur de croissance des fibroblastes FGF-23

Le FGF-23 est une hormone peptidique produite par les ostéoblastes et les ostéocytes (26). Elle joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie phosphocalcique. Sous sa forme dite « intacte », le FGF-23 est composé d'une chaîne peptidique de 227 acides aminés hautement glycosylés. Lorsque il est clivé pour générer deux fragments (fragment N-terminal et fragment C-terminal), le FGF-23 devient inactif entraînant un déclin de ses taux sériques (27). Cependant, seule l'hormone intacte possède une activité biologique. Dans le contexte de l'hyperphosphatémie chronique observée au cours de l'IRC, par deux actions synergiques, i) le FGF-23 entraîne une surexpression des transporteurs rénaux de phosphate (NaPi-IIa et IIc) et une augmentation de l'excrétion dans le tubule rénal proximal du phosphate, ii) il induit une baisse de l'absorption du phosphate intestinal en réprimant fortement la production rénale de 1,25-(OH) 2D. Les actions médiées par le FGF-23 exigent sa liaison avec un récepteur de la famille des FGFRs et son interaction avec un corécepteur appelé Klotho. En coordination avec ce dernier, le FGF-23 induit une diminution de la synthèse de la PTH dans les cellules des glandes parathyroïdes. Bien que le FGF-23 protège l'organisme de l'excès en vitamine D et maintient la coordination de l'homéostasie du phosphate avec le processus de minéralisation osseuse, des défauts de production du FGF-23 sont responsables de l'apparition de plusieurs troubles de l'homéostasie du phosphate (acquises et héréditaires)

(28). Par ailleurs, l'augmentation des concentrations sériques de FGF-23 est fortement corrélée à la morbi-mortalité cardiovasculaire, qu'elle soit au sein de la population normale (29) ou chez les patients atteints d'IRC (30).

3.3. La parathormone (PTH)

La PTH est une hormone peptidique composée de 84 acides aminés avec une courte demi-vie de 20 à 30 minutes dans le sang. Principalement, sa partie N-terminale de 34 acides aminés est responsable du contrôle de l'homéostasie phosphocalcique au niveau rénal et osseux. Cette hormone est hypercalcémiant et hypophosphatémiant, elle est produite par les cellules parathyroïdiennes puis secrétée sous contrôle des concentrations extracellulaires du Ca^{2+} (contrôle négatif). La fixation de la PTH à son récepteur couplé à la protéine G, PTHR, est nécessaire pour la plupart de ses actions (31). La liaison de la PTH à son récepteur induit une résorption de calcium et une libération du phosphate. En effet, la détection des taux de calcium est assurée par les récepteurs sensibles au calcium (CaSR). Les CaSR sont stimulés par l'hypercalcémie. Au niveau de l'anse de Henlé, le processus de réabsorption de calcium dépend du gradient électrique transépithéliale secondaire à l'activation des cotransporteurs $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ (NKCC2). L'électropositivité du côté lumenale de la cellule épithéliale générée suite du transport d'un ion sodium et deux ions chlorure vers le cytoplasme et ce à travers les cotransporteurs NKCC2. Ainsi, ce signal permet le transfert des ions calcium entre les cellules. Bien que la PTH diminue l'abondance des transporteurs Na/Pi, elle assure également le couplage entre le canal TRPV5 lumenal et le canal échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ basolatéral favorisant ainsi la réabsorption du calcium (32). A l'inverse de l'hypercalcémie, une hypocalcémie provoque, sous l'action de la PTH, une augmentation du relargage osseux du calcium et un freinage de la clairance du calcium.

Bien que le phosphate stimule les effets de la PTH et stabilise l'ARNm de la PTH, la PTH freine la réabsorption du phosphate dans le tubule proximal rénal conduisant à une diminution de la phosphatémie par réduction l'expression des transporteurs NaPi-Iia et Iic dans les tubules proximaux. Enfin, la PTH stimule l'activation de la 1-alpha hydrolase favorisant la réabsorption du phosphate dans l'intestin (33).

3.4. Le calcium

Dans l'os, le calcium est principalement présent sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite (99%). Contrairement au Pi, le calcium seul ne peut intervenir dans la transdifférenciation des CMLVs mais il peut entraîner le processus de nucléation en induisant leur apoptose. En effet, les débris cellulaires issus de la mort des CMLVs constituent des niches pour la calcification. De plus, Kapustin *et al* ont démontré que dans les vésicules matricielles, le calcium induit la baisse des niveaux de la matrix-Gla-Protéine (MGP), une protéine anti-calcifiante (34).

3.5. L'ostéopontine

Exprimée au niveau des tissus minéralisés et localisée au niveau des vaisseaux sains, l'ostéopontine (OPN) est une phosphoprotéine glycolysée. Elle est impliquée dans l'inhibition de la calcification des tissus en empêchant la formation d'hydroxyapatite et en activant les ostéoclastes. L'OPN régule le développement de la minéralisation vasculaire et sa présence à des concentrations très élevées au niveau vasculaire témoigne d'une calcification locale. *In vivo*, l'équipe de Speer *et al* a démontré que l'invalidation d'*opn* potentialise le développement des calcifications artérielles chez des souris déficientes en MGP (35). Bien que l'effet protecteur que l'OPN possède contre la minéralisation soit bien établi, les mécanismes impliqués restent très peu connus.

Par ailleurs, il a été rapporté dans un modèle de calcification des CMLVs humaines que l'action inhibitrice de l'OPN est dépendante des modifications post traductionnelles de cette phosphoprotéine. Les chercheurs ont confirmé après comparaison de l'effet de fragments phosphorylés ou non de l'OPN sur les CMLVs calcifiées que seule l'OPN phosphorylée est capable de limiter la calcification de ces cellules (36). Outre la fonction inhibitrice de la calcification, l'OPN est fortement associée aux maladies chroniques inflammatoires y compris l'athérosclérose en agissant comme une cytokine pro-inflammatoire avec une action sur le remodelage vasculaire et l'angiogenèse (37).

3.6. L'ostéoprotégérine

Appartenant à la superfamille des TNF, l'ostéoprotégérine (OPG) est une protéine qui possède une action inhibitrice sur la différenciation des ostéoclastes. Ces dernières sont impliquées dans la phase de résorption au cours du processus de remodelage osseux. L'OPG agit en tant que récepteur, et son action est dépendante de la fixation de son ligand polypeptidique (OPGL) (38). Il a été démontré par Yuichi *et al*, que l'invalidation génétique de *l'Opg* chez la souris mène rapidement à une calcification au niveau artérielles.

De plus, l'activité de la PAL, qui est impliquée dans la synthèse du Pi à partir de l'ATP, des souris invalidées pour *opg* s'avère nettement augmentée par rapport à des souris sauvages soumises ou pas à une alimentation riche en phosphate associée à une injection de calcitriol (stimulant l'absorption intestinale de phosphate et de calcium). L'OPG régulerait ainsi négativement l'activité de la PAL et induit des effets anticalcifians dans ce modèle de calcification vasculaire aortique (39). Une autre étude *in vivo* a montré que la délétion à la fois de l'OPG et de l'apolipoprotéine E (ApoE) chez la souris entraîne la formation de lésions athérosclérotiques très avancées et des dépôts calciques plus étendus au niveau de l'intima et de la média aortiques en comparaison aux souris uniquement déficientes en ApoE (40).

3.7. La fétuine A

La fétuine A ou l'alpha2-HS-glycoprotéine, est une glycoprotéine synthétisée par le foie qui circule dans le corps. Elle possède la capacité de se lier aux complexes Ca-Pi, ce qui limite la croissance des cristaux d'hydroxyapatite (41). De plus, elle exerce une action inhibitrice sur l'apoptose des CMLVs (42). Un faible taux de fétuine A est corrélé à une augmentation de la calcification et à une élévation du risque de décès d'origine cardiovasculaire (43). On a également observé une carence en fétuine A chez les patients atteints de maladies rénales chroniques et chez les individus à risque élevé de maladies cardiovasculaires. Cette carence est associée à une corrélation négative entre les niveaux de fétuine A et les calcifications valvulaires cardiaques et abdominales (44,45). Des études sur des souris invalidées pour le gène codant pour la fétuine A ont montré qu'elles développaient une calcification sévère dans divers organes lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en calcium, en phosphate et en vitamine D (46).

3.8. La Matrix GLA protein (MGP)

La protéine MGP est exprimée dans divers types cellulaires, notamment dans les CMLVs et les chondrocytes, où elle exerce une fonction locale de protection contre la calcification (47). Son effet sur la calcification dépend de la carboxylation de certains de ses résidus d'acide glutamique, une réaction catalysée par des gamma-carboxylases dépendantes de la vitamine K. Une fois carboxylée, la MGP se lie aux cristaux d'hydroxyapatite pour entraîner leur croissance (48). De plus, elle peut se lier à BMP-2 et inhiber ainsi les effets inducteurs d'ossification des CMLVs (49). Chez l'homme, une mutation inactivatrice de la MGP est à l'origine du syndrome de Keutel, une maladie génétique rare à transmission autosomique récessive. Les conséquences de cette mutation sont graves et incluent une calcification généralisée des cartilages (50). Les souris déficientes pour le gène de la MGP développent des calcifications au niveau de l'aorte ainsi que des calcifications cartilagineuses, en particulier au sein du cartilage de croissance. Cela se traduit par une petite taille, une fragilité osseuse et la survenue fréquente de fractures (51).

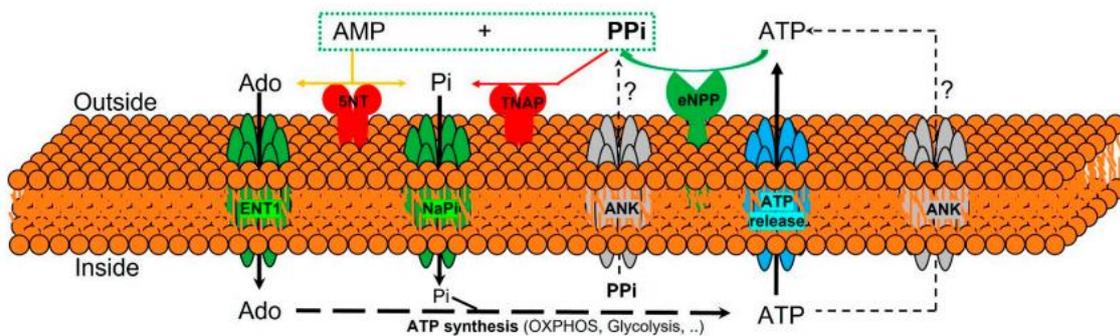


Figure 6 : Représentation schématique des transporteurs et des ectoenzymes impliqués dans le métabolisme du pyrophosphate inorganique extracellulaire

Le principal régulateur du pyrophosphate (P_i) extracellulaire est l'ecto-nucléotide pyrophosphatase phosphodiesterase (eNPP) qui est responsable de l'hydrolyse de l'ATP. Cette hydrolyse génère le P_i et l'adénosine-5'-monophosphate (AMP). Sous l'action de la phosphatase alcaline tissulaire non spécifique (TNAP), le P_i est dégradé en phosphate inorganique (Pi). L'ATP est libérée par la cellule par différents mécanismes tels que les canaux membranaires et l'exocytose. La protéine ANK (Progressive Ankilosis) est dotée de la capacité de transport extracellulaire du P_i et de l'ATP (52).

3.9. Le pyrophosphate inorganique (PPi)

Le pyrophosphate inorganique peut provenir de plusieurs réactions biochimiques intracellulaires et de cascades de signalisation extracellulaire ; son rôle dans plusieurs processus biologiques fondamentaux a été décrit par Heinonen en 2001 (53). Il est composé de deux molécules de phosphate inorganique reliées par une liaison hydrolysable d'ester. L'action principale du PPi est d'agir comme un inhibiteur de la formation d'hydroxyapatite. Il peut également agir comme une molécule de signalisation dans le but de réguler l'expression des gènes cibles et d'effectuer une régulation de sa propre dégradation (54). Chez les mammifères, Le PPi n'est pas produit directement à l'inverse des autres animaux et des bactéries qui peuvent le synthétiser. La production du PPi dépend fortement de la biodisponibilité extracellulaire des deux nucléotides ATP et UTP. A partir de l'hydrolyse de la liaison phosphodiester de l'UTP et de l'ATP, le PPi est généré. L'hydrolyse de l'ATP/UTP en PPi puis en monophosphate est catalysée par la famille des enzymes ecto-nucléotide pyrophosphate (eNPP) ou phosphodiesterase. Ces enzymes sont très conservées entre les espèces, trois d'entre elles sont impliquées dans la génération du PPi à savoir : eNPP1 (ou PC-1), eNPP2 (ou autotaxine) et enfin eNPP3 (ou B10) (55). En effet, après une lésion membranaire sous l'action de différents stimuli (hypoxie, stress mécanique, vitamine D et exocytose vésiculaire), les cellules libèrent de l'ATP. Ce dernier une fois dans l'environnement extracellulaire peut soit induire la signalisation purinergique locale via des actions autocrines/paracrines ou bien subir une dégradation par les ecto-nucléotidases. Les eNPPs vont rapidement hydrolyser l'ATP pour produire l'AMP et du PPi.

Par ailleurs, la protéine membranaire ANK (ankylose progressive ou ANKH) assure le transport du PPi du milieu intracellulaire vers l'environnement extracellulaire participant ainsi à l'augmentation des taux du PPi extracellulaire. L'ANK peut également assurer le transport extracellulaire de l'ATP. Le PPi inhibe le phénomène de cristallisation du calcium et du phosphate et prévient ainsi la formation des cristaux d'hydroxyapatite. Il peut ainsi se lier à la surface des cristaux d'hydroxyapatite empêchant leur maturation et leur croissance freinant *in fine* la progression des calcifications artérielles. De plus, le PPi peut également réguler l'expression des gènes comme celui de l'*OPN* (43,44).

Par ailleurs, Il existe une balance entre les niveaux de production et d'hydrolyse du PPi témoignant d'une régulation très fine de la concentration de PPi. Un acteur clé de la

dégradation du PPI est la PAL non spécifique tissulaire (tissue non-specific alkaline phosphatase ou TNAP) qui est la seule des phosphatases alcalines impliquée dans ce processus et dans la minéralisation. En effet, la TNAP décompose le PPI en deux phosphates conduisant à la diminution des concentrations extracellulaires de PPI. Par ailleurs, des travaux ont suggéré que le PPI exerce des effets inhibiteurs directs sur la TNAP (55).

3.9.1. L'homéostasie du phosphate

La régulation de la phosphatémie fait intervenir des dialogues entre le rein, l'intestin, le tissu osseux et les glandes parathyroïdiennes. L'absorption du phosphate au niveau intestinal peut s'effectuer soit par un mécanisme passif (dépendant du gradient de concentration), soit par transport actif (le co-transporteur sodium/phosphate NPT). la capacité d'absorption du phosphate dans l'intestin est modulée majoritairement par la vitamine D et le calcitriol (58). Par ailleurs, la réabsorption rénale du phosphate au niveau des co-transporteurs sodium-phosphate dans le tubule proximal est régulée par le couple FGF-23/Klotho. En effet, lors d'une élévation de la phosphatémie, les ostéocytes du tissu osseux sont stimulés et sécrètent du FGF-23. La liaison de celui-ci avec son récepteur (le FGF-R) et son corécepteur (Klotho) induit une baisse de la capacité de réabsorption rénale du phosphate par inhibition de l'expression des co-transporteurs sodium-phosphate NPT-2a et NPT-2c présents au niveau de la bordure en brosse des tubules proximaux. De plus, le FGF-23 inhibe l'expression de l'enzyme 1-alpha hydroxylase dans le tubule proximal aboutissant à une diminution de la synthèse de calcitriol. Ce déclin de la calcitriolémie, favorise une baisse de l'absorption intestinale du phosphate sous l'action du FGF-23, ce qui majore son action hypophosphatémiant. Par ailleurs, l'hyperphosphatémie est aussi responsable de l'élévation des concentrations plasmatiques de la PTH, un autre régulateur de la phosphatémie. Le FGF-23, par son action sur la calcitriolémie, entraîne également une augmentation de la sécrétion de PTH. Comme précédemment décrit, celle-ci agit sur les co-transporteurs sodium-phosphate, diminuant ainsi la réabsorption rénale du phosphate et donc la phosphatémie.

En effet, le squelette constitue un réservoir de stockage de phosphates. Dans les conditions physiologiques, les quantités de phosphates libérées quotidiennement à partir de l'os suite à la résorption osseuse ostéoclastique s'équilibrent avec les quantités de phosphate déposées pour la formation osseuse ostéoblastique, de telle sorte que le stock osseux de

phosphates reste constant et ne participerait pas directement à la régulation systémique de la phosphatémie. Cependant, dans certaines conditions pathologiques, notamment lors de l'IRC, la rétention rénale du phosphate est à l'origine des déséquilibres de l'homéostasie minérale. Ces troubles sont alors compensés par une adaptation de l'organisme caractérisée par une élévation du FGF-23 et de la PTH, une diminution du calcitriol et de Klotho. L'hyperparathyroïdie secondaire, consécutive à ces troubles minéraux, s'accompagne alors de troubles osseux et vasculaires (figure 7) (59).

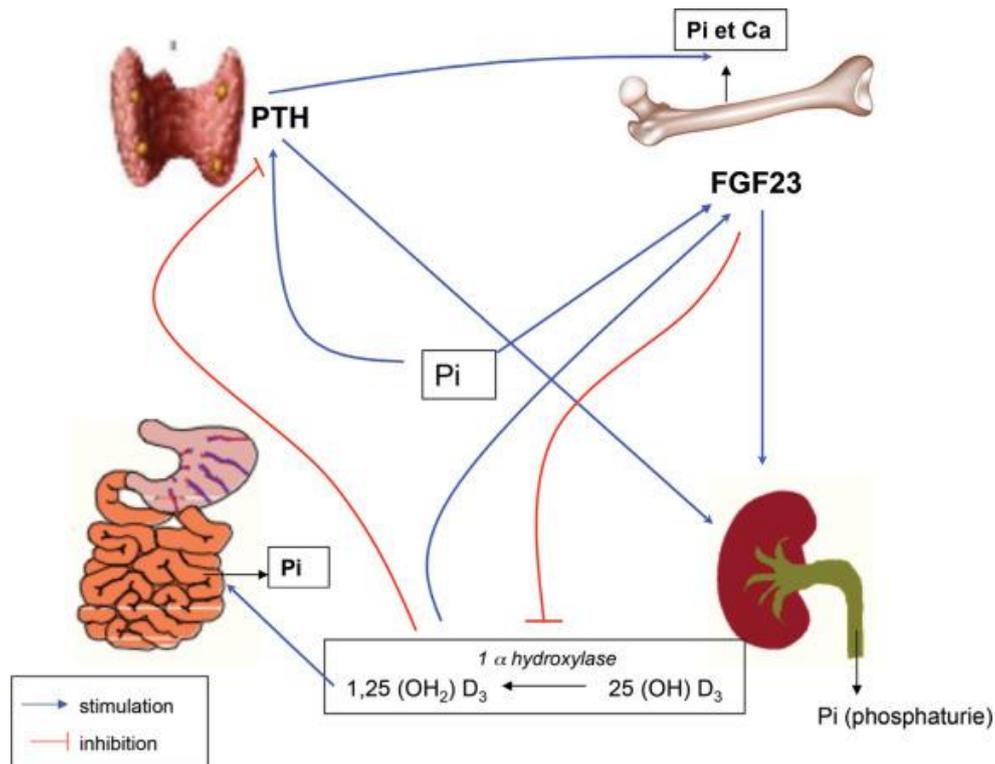


Figure 7 : Régulation de la phosphatémie sous la dépendance de l'os, des reins et de l'intestin en physiologie et au cours de la maladie rénale.

D'après (59).

3.10. La phosphatase alcaline tissu non spécifique (TNAP)

Les phosphatases alcalines (PALs) possèdent une action d'hydrolyse et de déphosphorylation des molécules ayant un Pi tels que : les nucléotides, les phosphoprotéines, les alcaloïdes et les polysaccharides. Les PALs jouent un rôle important au niveau systémique et local, et leur activité est pH-dépendante. Les PALs sont d'expression ubiquitaire mais sont

retrouvées en abondance au niveau du rein et du foie. Chez l'homme, les PALs sont retrouvées sous 4 formes à savoir les TNAP, les PALs intestinales, les PALs placentaires et les PALs présentent à la membrane cellulaire des cellules germinales.

La TNAP est une ectoenzyme clé de la régulation des concentrations locales du PPi et ainsi ; la seule engagée dans le développement de la minéralisation. Elle est localisée au niveau de la membrane cellulaire de différents types cellulaires à savoir les ostéoblastes, les ostéoclastes et des chondrocytes hypertrophiés. Cet enzyme est capable d'induire l'hydrolyse du PPi en Pi formant les cristaux d'hydroxyapatite. Bien que la TNAP ait la capacité de dégrader l'ATP et l'AMP, son action est moins puissante que celle d'eNPP1 et du CD73. Des études *in vitro* et *in vivo* avaient démontré qu'une surexpression de la TNAP génère une diminution des concentrations plasmatiques du PPi à l'origine d'un développement accru des calcifications artérielles.

3.11. La dégradation de l'élastine

L'élastine est un composant majeur de la couche médiale des artères. Sa dégradation joue un rôle important au cours du développement et de la progression de la calcification vasculaire. Sous l'action des protéases (sérine et cystéine) et des élastases, connues également sous le nom de métalloprotéinases, les fibres d'élastine sont fragmentées. Les produits de dégradation de l'élastine possèdent une affinité très élevée envers le calcium favorisant ainsi la croissance et maturation des cristaux d'hydroxyapatite. Par ailleurs, à la surface des CMLVs, il existe un récepteur à l'élastine-laminine sur lequel des peptides dérivés de l'élastine peuvent se fixer (60). La liaison ligand-récepteur stimule la différenciation ostéochondrogénique en favorisant la prolifération des CMLVs et la surexpression du gène procalcifiant *RUNX2*.

4. La pathogenèse de la calcification vasculaire

Il existe des dépôts calciques au niveau de la couche médiale des vaisseaux chez les patients insuffisants rénaux chroniques qui est d'autant plus importante que la fonction rénale diminue. Il a été décrit que ces dépôts résultent d'un processus hautement actif. Il s'agit d'une

ossification des vaisseaux favorisant la différenciation des CMLVs en cellules ostéoblastiques. Il a ainsi été rapporté *in vivo* par Shanoutouf *et al*, la présence d'une augmentation de la TNAP et des protéines ostéogéniques au niveau de la paroi des artères de patients atteints d'IRC (61).

En effet, il existe au cours de l'IRC un déséquilibre du métabolisme minéral associé à une altération de la balance phosphocalcique. Il est à noter que le développement de la calcification est stimulé par l'élévation de la phosphatémie qui est capable de d'induire, de maintenir et de potentialiser la calcification au niveau vasculaire. Par ailleurs, dans un modèle d'hyperparathyroïdie secondaire à l'IRC induite par une néphrectomie des 5/6^{ème} chez des rats nourris avec une alimentation riche en phosphate, le développement d'une hyperparathyroïdie est observé aboutissant à l'augmentation des taux plasmatique de calcium d'origine intracellulaire et s'accompagnant d'un contenu calcique très abondant au niveau vasculaire aortique et coronaire

Un autre acteur de la calcification vasculaire est la vitamine D. Un déclin de la vitamine D a été retrouvé dans plusieurs pathologies (le diabète, les maladies auto-immunes, les maladies cardiovasculaires, le cancer, les maladies neurodégénérative et la tuberculose) (62). Lors de l'IRC, le déficit en vitamine D est lié au développement de l'hyperparathyroïdie et de l'hypocalcémie. En effet, la carence en vitamine D augmente au cours de l'évolution de l'IRC. Cependant, en comparaison à une population à fonction rénale normale et avant le stade de la dialyse, la progression de la maladie rénale chronique n'est pas liée à l'augmentation du déficit en vitamine D (63). Il a été démontré par *Shiol* et ses collaborateurs qu'il existait une production locale de la vitamine D par les macrophages qui pourrait favoriser la formation de la calcification dans l'intima. Les auteurs suggèrent aussi que les macrophages ont un rôle dans le changement phénotypique des CMLVs en cellules avec des caractères ostéoblastiques (64). De plus, le traitement par la vitamine D chez les patients dialysés participerait à l'augmentation des taux sériques de phosphate, des produits phosphocalciques et de la PTH et ainsi à l'installation de la calcification vasculaire, principalement coronarienne (65).

5. La transdifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires

Les CMLVs ont une propriété contractile régulée par un ensemble de signaux issus des cellules endothéliales. Ces dernières participent également au maintien de leur faible niveau de prolifération et de sécrétion mais également aux processus de différenciation de ces cellules.

L'état contractile des CMLVs exige l'expression de certains marqueurs de l'appareil contractile tels que l'actine alpha (alpha-smooth muscle actin, α SMA), la chaîne lourde de la myosine (smooth muscle myosin heavy chain, SMMHC ou myh11) et la protéine 22-alpha (smooth muscle protein 22-alpha, SM22 α) (66). SMMHC hydrolyse une molécule d'ATP en ADP et Pi permettant la contraction de la CMLV après fixation de calcium. Lors de la transdifférentiation des CMLVs d'un phénotype contractile vers un phénotype ostéoblastique, l'expression des gènes *CBFA1* (core-binding factor subunit alpha-1), *RUNX2* augmente. Il s'agit de marqueurs précoces appartenant à la famille des facteurs de transcription ayant la capacité d'induire l'expression d'autres gènes spécifiques aux ostéoblastes dans les CMLVs (67).

Un autre facteur de transcription, Sox9 (SRY-box 9) possédant une séquence spécifique au niveau de l'ADN, entraîne la différenciation chondrocytaire (68). Msx2 (Msh Homeobox 2) est aussi impliqué dans cette voie et l'augmentation de son expression au niveau de CMLVs mises en culture dans des conditions pro-calcifiantes et dans des aortes calcifiées humaines a été observée (69). Ainsi, la détermination de ces modifications transcriptomiques constitue un outil indispensable à la caractérisation des diverses populations cellulaires que l'on retrouve au sein d'un tissu et sur le processus de différenciation des CMLVs. Kawai *et al* ont rapporté qu'en réponse à des signaux environnementaux tels que certains stimuli hormonaux, des lésions et des contraintes mécaniques ou encore des facteurs pro-athérogéniques, les CMLVs vont d'abord se transformer en cellules à profil sécrétoire en plus de leur phénotype contractile (70). Ensuite, la perte de contractilité des CMLVs est régie par le changement du profil transcriptomique à savoir la stimulation des facteurs de transcription Cbfa1/Runx2, Msx2 et Sox9. Ce phénomène se caractérise également par la baisse d'expression des gènes spécifiques des CMLVs contractiles SM22a ou α -SMA (71). Les CMLVs dédifférenciées vont avoir un phénotype différent caractérisé par une prolifération accrue et vont se mettre à produire des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, des espèces réactives de l'oxygène et des chimiokines. Ces signaux favorisant le stress oxydant et l'inflammation qui entretiennent le processus de calcification.

Au cours de ce processus, l'ensemble des cytokines secrétées contribue à l'activation des CMLVs entraînant une libération accrue de BMP-2 et une baisse de l'expression de MGP (qui a pour rôle d'inhiber la signalisation ostéogénique de la BMP-2) et ainsi induire l'accélération du phénomène de la différenciation ostéogénique des CMLVs (72). L'inflammation stimule également l'activité de la TNAP, son expression est notamment régulée à la hausse par le TNF- α dans les CMLVs humaines. *In vitro*, Lencel *et al* ont démontré que la

surexpression de l'activité de la TNAP sous l'action du TNF- α est totalement dépendante de l'inhibition de PPAR γ dans les CMLVs (73).

6. L'évaluation de la calcification artérielle

La calcification artérielle est un facteur de risque cardiovasculaire d'où l'importance de mesurer et quantifier le score calcique artérielle. Les répercussions sur le plan cardiovasculaire de la calcification sont en effet majeures à savoir : l'augmentation de la rigidité aortique objectivée cliniquement par l'augmentation de la vitesse de l'onde de pression, et l'hypertension artérielle. Sur le plan pratique, les scores de la calcification peuvent être obtenus par imagerie vasculaire en particulier par radiographie standard lombaire et tomographie. Il n'est cependant pas possible de distinguer la calcification de la média de celle de l'intima artérielle.

7. Stratégies thérapeutiques potentielles

7.1. eNPP1 recombinant

La pseudoxanthome élastique et la calcification artérielle généralisée de l'enfant sont deux maladies génétiques, avec un mode de transmission autosomique récessif, caractérisées par l'apparition de calcifications ectopiques et notamment artérielles (74) (75). Dans leur travaux, Yvonne Nitschek *et al*, ont mis en évidence des mutations affectant les gènes *ENPP1* et *ABCC6* chez les patients atteints par ces deux maladies (76). Par ailleurs, les souris déficientes pour le gène *enpp1* développent des calcifications coronaires, rénales, hépatiques et intracardiaques qui s'accompagnent d'une augmentation des concentrations plasmatiques du PPI et de la mortalité. L'administration d'une protéine recombinante eNPP1 permet chez ces souris de s'opposer au développement de ces anomalies en normalisant les taux sériques de PPI (77). De la même façon, une alimentation enrichie en PPI chez des souris déficientes pour le gène *abcc6*, permet de limiter le développement des calcifications artérielles et de la peau.

7.2. Les bisphosphonates

Les bisphosphonates (BPs) sont des analogues stables du PPI. Des travaux précédents avaient démontré que ces analogues sont de puissants inhibiteurs de la calcification et de sa progression. *In vitro* et *in vivo*, le PPI et les BPs peuvent se lier aux cristaux d'hydroxyapatite et limiter ainsi leur maturation. Le principe est basé sur un échange de molécule de phosphate entre les cristaux d'hydroxyapatite en formation, un principal constituant de la phase minérale de l'os, et les molécules de phosphate des BPs. Pour cela, au niveau de la surface osseuse et par liaison aux ions calcium, les BPs sont adsorbés et vont se lier aux cristaux d'hydroxyapatite via des liaisons de forte intensité (78). Dans d'autres pathologies telles que l'ostéoporose, la maladie de Paget ou les maladies osseuses métastatiques, les BPs ont montré leur capacité à inhiber le processus ostéoblastique (65,66). Des études précédentes ont permis de mettre en lumière le rôle protecteur des BPs sur le développement des calcifications artérielles dans des modèles animaux présentant des mutations génétiques. Dans un modèle murin de calcification artérielle généralisée de l'enfant, la supplémentation des souris délétées pour le gène *abcc6* avec un régime contenant des BPs, étidronate et alendronate, a permis une diminution des calcifications (80). Ces données encourageantes ont conduit à l'utilisation en clinique des BPs chez les patients touchés par cette maladie (81).

De plus, ces effets protecteurs des BPs ont été retrouvés par une équipe néerlandaise qui a démontré l'efficacité de l'étidronate pour limiter la calcification artérielle et la néovascularisation sub-rétinienne chez les patients atteints de pseudoxanthome élastique (82). En revanche, il existe des effets secondaires liés à l'utilisation des bisphosphonates. Bien que rares, ces effets restent non négligeables. Le traitement par les BPs entraîne en effet une altération de la microarchitecture osseuse, une ostéonécrose de la mâchoire et des fractures fémorales atypiques.

7.3. La vitamine K

La vitamine K est une vitamine liposoluble qui présente une structure composée d'un cycle 2-méthyl-1,4-naphthoquinone et d'une chaîne latérale en position 3 carbone, avec une variabilité en termes de longueur et de degré de saturation. Elle existe naturellement sous deux

formes principales : la vitamine K1, également appelée phylloquinone, et la vitamine K2, connue sous le nom de ménaquinone (MK). La vitamine K2 est la forme la plus puissante de la vitamine K et présente une demi-vie plus longue que la vitamine K1. De plus, la ménaquinone-4 (MK-4) est la forme prédominante de vitamine K dans les tissus humains et animaux, et elle peut être produite à partir de la ménadione grâce à l'action de la protéine 1 contenant le domaine UbiA prényltransférase (UBIAD1). La vitamine K possède la capacité de prévenir la calcification vasculaire grâce à deux mécanismes principaux : un effet anti-inflammatoire et la promotion de la γ -carboxylation de la MGP. L'importance de la MGP active dans la prévention de la calcification vasculaire a été confirmée par plusieurs études cliniques qui ont mis en évidence des effets favorisant la calcification des artères par la warfarine, un antagoniste de la vitamine K (83). L'action anti-inflammatoire de la vitamine K a été démontrée dans diverses études *in vitro* et *in vivo* (84,85). De plus, dans une étude transversale réalisée au sein de la cohorte Framingham (n=1381), il a été observé que les taux sanguins de la vitamine K1 ainsi que l'apport en cette vitamine étaient en corrélation inverse avec les marqueurs généraux de l'inflammation circulants, tels que le ligand CD40 et l'IL-6 (86). De plus, une analyse transversale auprès de 662 adultes issue de la Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) a montré que des niveaux sériques plus élevés de phylloquinone étaient associés à divers indicateurs inflammatoires, dont l'IL-6, l'ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire soluble-1) et la CRP (87).

Il existe quelques études évaluant l'effet de la supplémentation en vitamine K sur la calcification des artères coronaires. Dans un essai contrôlé randomisé prospectif, il a été constaté que la supplémentation en vitamine K1 réduisait considérablement la progression de la calcification des artères coronaires. Cette réduction était particulièrement significative dans un sous-groupe de participants qui étaient $\geq 85\%$ adhérents à l'intervention (88). Une autre étude, comprenant 42 patients atteints d'IRC de stades 3 à 5, a montré que l'augmentation de l'épaisseur intima-média de la carotide commune était significativement plus faible dans le groupe recevant une supplémentation K2 à une dose de 90 μg avec 10 μg de cholécalciférol (vitamine D) par rapport au groupe recevant seulement du cholécalciférol (89). De plus, l'augmentation des calcifications coronaires a été légèrement plus faible dans ce groupe mais pas de façon statistiquement significative (89). De plus, une étude, menée auprès de 26 patients supplémentés avec de la vitamine K pendant un an, a montré qu'il existait toujours une augmentation annuelle de 14% des calcifications coronaires, mais sans modification significative de la rigidité artérielle (90).

7.4. L'administration exogène du PPI

Afin de corriger le déficit plasmatique en PPI au cours des calcifications, l'apport du PPI exogène semble être l'approche la plus évidente et directe. Dans des modèles murins de calcifications artérielles, différentes voies d'administration du PPI ont été testées et notamment la voie sous-cutanée. Ainsi, le traitement des rats rendus urémiques, associé à un régime riche en phosphate, par le PPI diminue le contenu calcique de 70% au niveau aortique et ne présente aucun effet indésirable sur la minéralisation osseuse (91). En revanche, l'apport de PPI exogène par cette voie est limitée en clinique du fait du développement de nodules cutanée au niveau du site d'injection et qui peuvent entraîner une nécrose de la peau (92).

L'étude de Riser *et al* s'est également intéressée à cette approche thérapeutique par l'administration intra-péritonéale du PPI chez des rats insuffisants rénaux n'exprimant pas le gène de l'apolipoprotéine E. L'apport exogène du PPI entraîne un effet inhibiteur sur le développement des calcifications de la média artérielle dans ce modèle mais sans impact sur les lésions athérosclérotiques (93). De plus, l'injection du PPI par voie intra-péritonéale permet de prévenir la formation de la calcification chez des souris déficientes pour le gène *abcc6* (94). Cependant, il apparaît primordial d'étudier les mécanismes régulant l'homéostasie du PPI afin de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques et développer des molécules actives par voie orale pour la prise en charge des calcifications ectopiques (95).

7.5. Les inhibiteurs de la TNAP

Une autre voie thérapeutique consiste à viser les voies de dégradation du PPI et notamment l'inhibition des TNAP. Cette dernière peut être induite par deux approches : en diminuant les niveaux d'expression de la TNAP ou en baissant son activité. En effet, l'étude de Lomashvili *et al* a permis de confirmer le lien fort entre la régulation de l'activité de la TNAP et la formation des calcifications liées aux maladies rénales chroniques identifiant ainsi la TNAP comme une nouvelle cible thérapeutique (96). Il a été démontré que le traitement des CMLVs invalidées pour le gène *ENPP1* par des inhibiteurs de la TNAP bloquait l'activité

pyrophosphatase de la TNAP et donc l'hydrolyse du PPi, conduisant à une baisse de la calcification *in vitro* et *ex vivo* sur des aortes de rats (97).

L'utilisation de cette classe d'inhibiteurs sélectifs *in vivo* chez des souris délétées pour le gène *Abcc6* a permis de montrer une diminution du développement et de la progression de la calcification sans effets délétères au niveau osseux en comparaison à d'autres traitements (98). Un inhibiteur spécifique et puissant de la TNAP, le 5-((5-chloro-2-méthoxyphényl)sulfonamido) nicotinamide (SBI-425) a été découvert en 2018 et testé pour son efficacité *in vivo* au cours de la calcification ectopique (99). L'utilisation de ce composé a permis de baisser la mortalité via l'atténuation des calcifications artérielles aortiques chez des souris insuffisantes rénales nourries avec un régime riche en adénine et phosphore (100).

8. La pathologie rénale calcifiante

8.1. L'insuffisance rénale chronique (IRC)

L'IRC constitue un véritable enjeu de santé publique du fait de l'augmentation accrue de son taux d'incidence et de prévalence résultant de l'augmentation de ses facteurs de risque majeurs (le diabète, l'hypertension artérielle, l'âge et certaines pathologies cardiovasculaires) (101). De plus, la maladie rénale chronique est associée à une élévation de la morbi-mortalité cardiovasculaire chez les patients (102). Par définition, la persistance d'une durée de plus de trois mois d'un DFG inférieur à 60 mL/ min/ 1,73 cm² ou d'un DFG supérieur à 60 mL/ min/ 1,73 cm² avec la présence d'un ou plusieurs biomarqueurs de l'atteinte rénale témoigne du développement de l'IRC (103) (figure 8). En effet, plus le stade de l'IRC est avancé, plus la prise en charge des patients est lourde en raison des nombreuses complications qui résultent de l'accumulation des toxines urémiques, du déséquilibre de la balance acido/basique, du développement d'une hypertension artérielle et des troubles du métabolisme phosphocalcique (104).

Composite ranking for relative risks by GFR and albuminuria (KDIGO 2009)				Albuminuria stages, description and range (mg/g)				
				A1		A2	A3	
				Optimal and high-normal		High	Very high and nephrotic	
				<10	10–29	30–299	300–1999	≥2000
GFR stages, description and range (ml/min per 1.73 m ²)	G1	High and optimal	>105					
			90–104					
	G2	Mild	75–89					
			60–74					
	G3a	Mild-moderate	45–59					
	G3b	Moderate-severe	30–44					
	G4	Severe	15–29					
	G5	Kidney failure	<15					

Figure 8 : La classification de l'IRC par stade en fonction du DFG

D'après (105).

8.2. La calcification artérielle de l'IRC

Au cours de l'évolution de l'IRC, la réduction de la masse néphronique conduit à une hyperphosphatémie en raison de l'incapacité du rein à éliminer le Pi. L'excès de phosphate dans le sang peut également déclencher la production de FGF-23. Le FGF-23 à son tour diminue la production de calcitriol, de la biodisponibilité du calcium, ce qui se traduit par une élévation des taux plasmatique de la PTH. L'hyperphosphatémie favorise donc une surproduction de la PTH induisant une hyperparathyroïdie. Un excès de production de PTH entraîne une augmentation de la résorption osseuse, ce qui induit la libération de calcium et du phosphate dans le sang. Cela crée un cercle vicieux dans lequel l'hyperphosphatémie provoque une augmentation de la production de PTH, qui à son tour aggrave l'hyperphosphatémie. De plus, l'augmentation des taux de la PTH circulante est positivement corrélée avec la perte d'élasticité artérielle chez des patients ayant bénéficié d'une greffe rénale (106).

Le processus de calcification artérielle se développe de manière asymptomatique et peut survenir à tous les stades de l'IRC. Ces calcifications sont plus abondantes au cours des stades évolués voire terminal de l'IRC. Au cours de ces stades et en plus de l'IRC, une inflammation de bas grade est caractérisée par l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires circulantes et notamment du TNF-alpha. Un autre évènement qui s'ajoute est la dégradation de l'élastine. Les fibres d'élastine sont des éléments majoritaires de la matrice extracellulaire au niveau artériel et notamment dans l'aorte. Lors de l'IRC, les toxines urémiques stimulent leur dégradation. Cette dégradation est responsable de l'augmentation des taux de TGF-béta qui est associée au déclenchement de la différenciation ostéoblastique des CMLVs. Par ailleurs, il a été décrit par Gauthier-Bastien *et al*, un développement de la calcification artérielle qui était étroitement lié à l'augmentation de la rigidité artérielle chez des rats insuffisants rénaux recevant un régime riche en calcium, phosphate et vitamine D. De façon intéressante, ce modèle a permis d'établir une corrélation négative entre l'augmentation de la pression pulsée et de faibles niveaux d'expression d'élastine avec un dépôts accru de collagène, témoignant d'une altération de l'architecture de la MEC, dans les zones calcifiées (107).

8.3. Les mécanismes de la calcification vasculaire lors de l'IRC

Les mécanismes physiopathologiques proposés et par lesquels la calcification vasculaire se développe et progresse au cours de l'IRC se composent de trois phases : l'initiation de la différenciation ostéoblastiques des CMLVs, la différenciation des progéniteurs vasculaires vers la lignée cellulaire ostéogénique et enfin la perte des acteurs inhibiteurs de la calcification. En cas d'IRC, l'accumulation des toxines urémiques et l'augmentation des concentrations de calcium et du phosphate provoquent la formation des vésicules lipidiques à partir des corps apoptotiques par les CMLVs. Les CMLVs sont capable de produire un autre type de vésicules, les vésicules matricielles, qui sont beaucoup plus petites que les corps apoptotiques et ont pour fonction de stimuler la nucléation des dépôts minéraux. En effet, les vésicules matricielles favorisent la nucléation du calcium sous une forme d'hydroxyapatite moins cristalline. Cette forme d'hydroxyapatite est retrouvée au niveau de la matrice extracellulaire riche en fibres d'élastine au niveau des artères. Toutefois, à mesure de la dégradation des fibres d'élastine, appelée processus d'élastinolyse, de la place se libère pour les vésicules matricielles et la transdifférenciation ostéochondrogénique des CMLVs est

stimulée. Cette transformation des CMLVs est en partie liée aux LDL oxydés et au peroxyde d'hydrogène qui résultent de l'augmentation du stress oxydant. Le processus ostéochondrogénique induit en effet un changement des CMLVs principalement au niveau génique avec l'augmentation de la PAL osseuse et la production accrue de collagène matriciel. Ainsi, la PAL osseuse induit l'hydrolyse du PPi localement, inhibiteur puissant de la calcification, avec la production des cellules de la lignée des ostéoblastes et des chondrocytes à partir des cellules vasculaires calcifiantes. L'activation des signaux canoniques Wnt et la production paracrine de BMP sont à l'origine de cette transformation ostéogénique. Un autre acteur du processus de minéralisation est l'inflammation qui stimule les cellules immunitaires et les cytokines inflammatoires dont le TNF α . Ce dernier joue un rôle important dans la libération de BMP et l'activation de la voie Wnt.

8.4. Toxines urémiques

Par définition, une toxine urémique est une substance qui s'accumule dans le sang et les organes des patients atteints d'IRC entraînant des conséquences néfastes sur diverses fonctions biologiques. On peut les classer en trois classes selon leurs propriétés physico-chimiques. Généralement, ces toxines sont classées en trois catégories en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, qui déterminent leur comportement au cours de l'hémodialyse : les petites molécules hydrophiles de moins de 500 Da, les composés de taille intermédiaire supérieure à 500 Da, et les molécules liées aux protéines. Enfin, une molécule est qualifiée de toxine urémique si elle présente les caractéristiques suivantes (108) :

- Elle doit être identifiée et caractérisée sur le plan chimique.
- Elle doit être détectable dans les échantillons biologiques.
- Chez les patients atteints d'IRC, ses taux sont accrus dans les fluides biologiques.
- Les effets pathologiques qu'elle engendre sont concentration-dépendants.
- L'administration de cette molécule à un animal permet de reproduire les effets du syndrome urémique.

Parmi ces toxines on retrouve l'indoxyl sulfate (IS), en raison de son impact délétère sur le système cardiovasculaire et qui suscite un intérêt considérable en recherche. L'IS circule principalement lié à l'albumine le rendant difficile à être éliminé par l'hémodialyse (109). En

conséquence, il s'accumule dans la circulation sanguine des individus souffrant d'IRC, atteignant des concentrations dépassant les 200 μM chez les patients sous hémodialyse, tandis qu'elle demeure en dessous de 2 μM chez les personnes en bonne santé (110). Barreto et ses collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence une relation entre la concentration sérique d'IS et la progression du stade de l'IRC (111). Par ailleurs, l'IS favorise le développement de l'hypertrophie cardiaque et augmente le stress oxydatif de façon concentration-dépendante, alors que d'autres toxines urémiques également liées aux protéines ont peu, voir aucun effet. Dans la suite de ce document, nous apporterons des éléments démontrant le rôle l'IS dans la calcification vasculaire associée à l'IRC.

Les altérations dans la communication entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires semblent jouer un rôle important au cours du développement des maladies cardiovasculaires. Ce dysfonctionnement du dialogue CEs-CMLVs est aggravé lors de l'IRC, en partie en raison de la progression de la calcification vasculaire. L'IS est l'une des principales toxines urémiques qui exerce un impact délétère à la fois sur les cellules endothéliales et sur les CMLVs. Il a été démontré par Dou *et al* que l'IS inhibe la prolifération des cellules endothéliales du cordon ombilical humain (HUVECs) et la réparation des lésions endothéliales *in vitro*. Une autre étude menée par cette même équipe a attribué cet impact à l'induction de la formation d'espèces réactives de l'oxygène notamment par la NADPH – oxydase (112,113). De plus, l'administration d'un précurseur inhibiteur de l'IS, l'adsorbant AST-120, a provoqué une augmentation de la production NO ainsi que de la forme réduite du glutathion chez 40 patients atteints d'IRC après 6 mois de traitement. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle l'IS pourrait induire un stress oxydatif (114). En stimulant l'expression de molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales, notamment la protéine chimio-attractante des monocytes-1 (MCP-1) et VCAM-1, via l'activation du facteur nucléaire kappa- B (NF- κ B), et la molécule d'adhésion des cellules endothéliales aux leucocytes, E-sélectine, l'IS participe à la progression de l'athérosclérose (115,116).

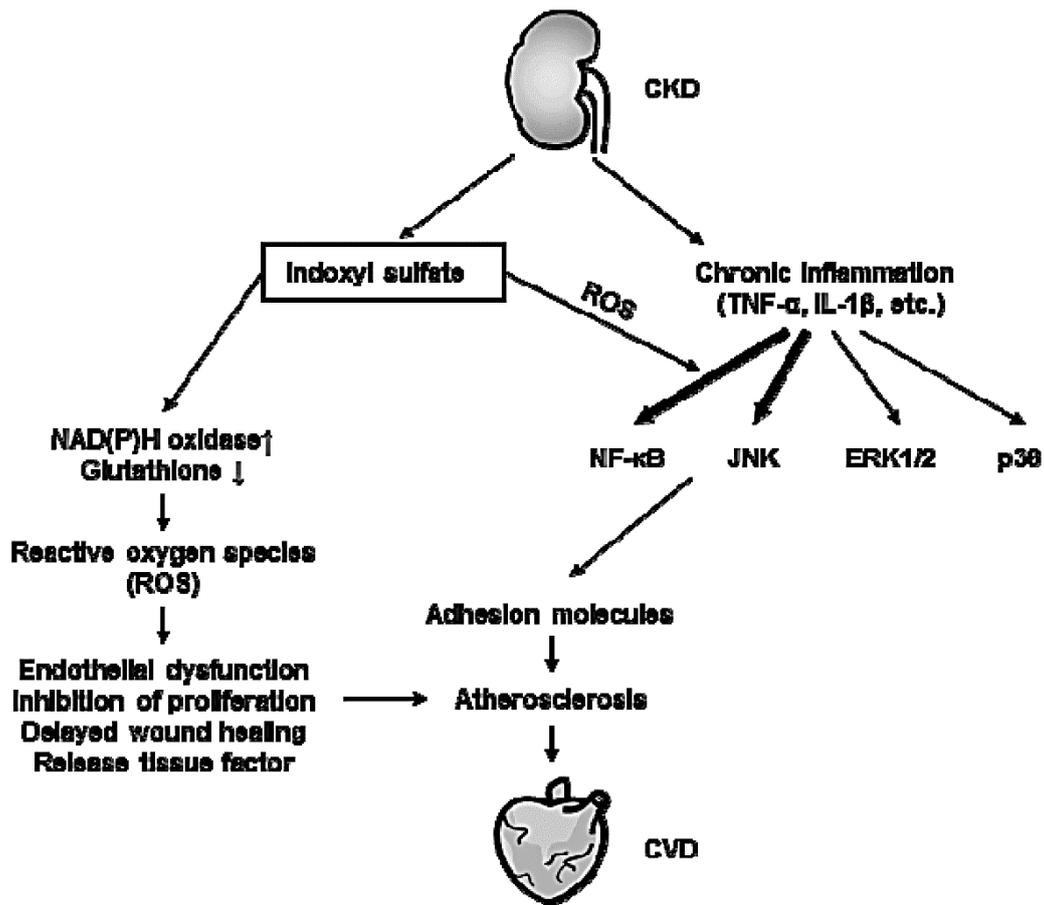


Figure 9 : L'effet de l'IS sur la fonction endothéliale et l'athérosclérose

D'après (117).

Par ailleurs, le milieu urémique accélère le processus de la transdifférenciation ostéogénique des CMLVs qui est à l'origine en partie de la calcification vasculaire (118). Dans une étude réalisée par Muteliefu *et al* il a été démontré *in vitro* que les CMLVs humaines exposées à l'IS exprimaient des marqueurs ostéogéniques tels que Runx2, la PAL et l'OPN, tout en étant soumis à un stress oxydatif (119). Plus tard, ces chercheurs ont montré que l'IS induit la sénescence des CMLVs humaines en stimulant l'expression de p53 par le biais des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Cette sénescence se traduisait par l'activité de la β -galactosidase, ainsi que par l'expression de la prélamine A. De plus, dans un modèle de rats urémiques traités avec de l'IS, l'administration d'AST-120 a permis de protéger les CMLVs aortiques contre la sénescence cellulaire induite par l'IS, ce qui a été confirmé par des analyses en immunohistochimie (46). De récentes recherches ont mis en évidence le rôle de l'IS dans le processus de calcification des CMLVs par le biais de différentes voies de signalisation à savoir

l'activation de la voie « c-Jun N- terminal kinas (JNK) », l'induction de la voie Wnt/ β - caténine et l'hyperméthylation de Klotho au niveau de l'ADN aboutissant à une baisse de son expression au niveau de la média de l'aorte (120–122).

8.5. Le PPI et l'insuffisance rénale chronique

O'Neill *et al* ont effectué des mesures de concentrations plasmatiques de PPI chez des patients avant et après leur séance d'hémodialyse. Il a constaté que ces patients présentaient des niveaux de PPI plus bas que ceux des individus en bonne santé, et que ces niveaux diminuaient après la dialyse (123). Cette baisse ne concerne pas seulement le PPI extracellulaire, mais également des altérations du PPI intracellulaire dans les globules rouges. Ces données révèlent que le métabolisme du PPI joue un rôle essentiel dans le processus de calcification, et désignent le PPI comme la principale cause des effets observés chez ces patients. Une autre étude réalisée auprès de patients en hémodialyse a révélé une augmentation de l'activité de la PAL après la séance de dialyse. Cette élévation de l'activité de la PAL était en corrélation avec le pH, de sorte que la légère alcalose survenant après la dialyse (pH pré-dialyse de 7,25 ; pH post-dialyse de 7,45) contribuait à cette élévation (124). D'autres molécules impliquées dans le métabolisme du PPI, comme l'ATP, présentaient des niveaux réduits après la dialyse. Le Pi agit comme un régulateur négatif de l'activité de la PAL, de sorte que l'élimination du phosphate lors de l'hémodialyse finit par entraîner une augmentation de l'activité de la PAL. De plus, les toxines urémiques favorisent l'augmentation de l'activité de la PAL et de l'hydrolyse du PPI au niveau aortique chez des rats urémiques et *ex vivo* sur des anneaux aortiques isolés de rats normaux (96).

9. La rigidité artérielle et la calcification vasculaire

Le développement d'une calcification dans la couche médiale des artères conduit à une augmentation de leur rigidité chez les sujets atteints d'IRC (125). Cette baisse de la compliance vasculaire se traduit par une hausse de la pression pulsée (différence entre la pression en systole et en diastole), menant en particulier à une augmentation du stress pariétal. La rigidité artérielle liée à l'IRC contribue également à l'altération de la vasomotricité

endothéliale. Mhairi *et al* ont démontré que cette augmentation de rigidité a un impact péjoratif négligeable sur la survie des patients dialysés (126).

10. Modèles de calcification artérielle médiale

10.1. Modèles de calcification *in vitro*

Peu de types cellulaires étudiés en laboratoire calcifient spontanément hormis les CMLVs isolées de rats spontanément hypertendus (127) et les péricytes (128). Les cellules nécessitent des stimuli spécifiques pour déclencher le processus de calcification. Les milieux de culture utilisés pour induire la calcification *in vitro* varient en termes de composition, comprenant des composants essentiels ainsi que des facteurs additionnels. Habituellement, ces milieux sont complétés par du sérum de veau fœtal (SVF) à des concentrations allant de 5% à 20% et en utilisant des concentrations de glucose faible (1 g/L) ou élevée (4,5 g/L). La supplémentation en phosphate peut être sous forme inorganique (comme les phosphates de sodium, à des concentrations de 1 à 5 mM) ou organique (par exemple, le β -glycérophosphate, à une concentration de 10 mM), pour stimuler la calcification de façon dose et temps-dépendants. L'acide ascorbique, un cofacteur nécessaire à diverses enzymes, est souvent ajouté aux milieux de culture. L'acide ascorbique influence la différenciation des cellules mésenchymateuses et favorise un changement de phénotype cellulaire. En stimulant, par exemple, la production de collagène de type I et IV ainsi que l'activité de la métalloprotéinase-2 matricielle (MMP-2), L'acide ascorbique favorise le remodelage de la MEC (129). De plus, la présence de l'acide ascorbique augmente l'activité de la PAL et les vésicules de la matrice extracellulaire riches en PAL contiennent davantage de minéraux de type apatite (130). D'autres composés fréquemment ajoutés aux milieux de calcification incluent le pyruvate de sodium, l'insuline et le calciférol. Une étude récente a comparé l'impact de différents facteurs tels que le phosphate, le calcium et le SVF sur le rendement et la reproductibilité de la calcification *in vitro* (131).

10.2. Modèles de calcification vasculaire *ex vivo*

L'utilisation des approches *ex vivo* permet de préserver la structure cellulaire vasculaire dans son ensemble afin de mieux étudier les mécanismes de calcification vasculaire (132). Actuellement, les chercheurs ont recours à la culture organo-typique d'anneaux aortiques de rats et de souris pour étudier la calcification vasculaire dans diverses conditions avec une durée de la stimulation qui varie généralement de 3 à 14 jours. En revanche, il est essentiel de noter que l'utilisation des anneaux aortiques, bien qu'elle se rapproche davantage du contexte physiologique, comporte certaines limitations. Par exemple, le côté luminal de l'anneau aortique n'est pas exposé à un flux sanguin similaire à celui qui existe *in vivo*, tandis que la média et l'adventice sont directement en contact avec le milieu de stimulation calcifiant ou d'autres substances utilisées pour induire la calcification. En outre, la signalisation endocrinienne physiologique est absente dans ce modèle (133).

10.3. Modèles de calcification vasculaire *in vivo* non liés à l'IRC

10.3.1. Souris déficientes en MGP

Les souris délétées pour le gène MGP développent une calcification médiale très marquée de l'aorte et de ses branches (134). Chez ces souris, les artérioles, les veines et les capillaires ne développent pas de calcification. Au moyen d'une coloration de von Kossa, permettant la révélation des sels de phosphate, de carbonate, de sulfate et d'oxalate de calcium, les dépôts calciques dans ce modèle prennent 2 à 3 semaines pour s'installer au niveau des lames élastiques de la média aortique. De plus, l'utilisation de ce modèle permet également d'étudier le développement des calcifications au niveau de la valve aortique et des coronaires.

Bien que ces animaux aient une durée de vie très courte (2 mois en moyenne), il a permis démontrer le rôle essentiel de la MGP dans de la prévention du développement de la calcification artérielle (134).

10.3.2. Rats warfarine/vitamine K

L'action protectrice de la MGP nécessite sa γ -carboxylation afin de pouvoir se lier aux cristaux d'hydroxyapatite et prévenir ainsi la calcification artérielle médiale. Sous l'action de l'enzyme γ - glutamate carboxylase (une enzyme dépendante de la vitamine K), la MGP subit une γ -carboxylation. En effet, la vitamine K hydroquinone est la forme de vitamine K biologiquement active qui est utilisée par la γ -carboxyglutamase. Par réaction enzymatique, la vitamine K hydroquinone se transforme en vitamine K époxydée. Afin que la vitamine K hydroquinone soit produite, la forme époxydée doit être réduite sous l'action de l'enzyme KO réductase formant ainsi la vitamine K quinone.

Cette dernière sera transformée en vitamine K hydroquinone par la vitamine K réductase. Par ailleurs, l'inhibition de la KO réductase et la vitamine K réductase est assurée par la warfarine empêchant ainsi la régénération de la vitamine K hydroquinone et *in fine* la γ -carboxylation de la MGP. Par conséquent, la non-activation de la MGP empêche sa fixation aux cristaux d'hydroxyapatite. Il a été démontré chez le rat que le traitement à long terme par la warfarine favorise la calcification des lames élastiques de la média des artères et des valves aortiques également (135). Ces résultats s'accompagnent également d'une augmentation des taux d'expression d'ARN messager de la MGP au niveau aortique (135). Même si les concentrations plasmatiques de la MGP présentes chez les animaux restent faibles, ces données suggèrent un mécanisme de compensation permettant de stopper ou de limiter la calcification artérielle en synthétisant plus de MGP. Ce traitement n'a néanmoins aucun impact sur la croissance osseuse.

10.3.3. Rats vitamine D3/nicotine

En 1985, fleckenstein *et al* avaient montré que le traitement de rats avec de la vitamine D3 et de la nicotine (modèle VDN) provoque une calcification artérielle au niveau de la média. (136). Le traitement impliquait l'administration initiale d'une dose importante de vitamine D3, suivie de doses biquotidiennes de nicotine pendant une durée de 5 jours. Les rats soumis à ce traitement ont développé une calcification substantielle de leurs artères mais sont décédés dans les 6 jours qui ont suivi la première administration de vitamine D3.

Des années plus tard, le groupe d'Atkinson a repris ce modèle dans le but d'améliorer la survie chez les animaux. Ainsi, en administrant une seule dose de vitamine D3 avec de faibles concentrations de nicotine, les chercheurs ont réussi à mettre au point un modèle d'élastocalcinose (137). Ce modèle animal de calcification artérielle médiale est associé à une modification des concentrations plasmatiques de calcium sans modification des niveaux des molécules anti-calcifiantes comme la MGP. En effet, la vitamine D3 conduit à une hypercalciurie de manière temporaire même lorsque les animaux sont mis sous un régime dépourvu de calcium.

Il convient de noter que l'action de la nicotine entraîne la potentialisation de l'accumulation de calcium à travers la libération accrue de Ca^{2+} intracellulaire et/ou en favorisant la libération des catécholamines (137). En effet, un jour après l'administration de la nicotine, une surcharge calcique est constatée tout au long du système cardiovasculaire. Cette augmentation du contenu calcique est observée chez les rats VDN avec des taux plus forts non seulement au niveau aortique mais aussi au niveau des reins et du cœur en comparaison aux animaux contrôles (137). Ainsi, la persistance de la surcharge calcique en l'absence des mécanismes de défenses par les acteurs anti-calcifiants conduit au dépôt et à la croissance des cristaux d'hydroxyapatite au niveau de la paroi artérielle.

10.3.4. Rats âgés

Tout comme l'homme, les parois artérielles de rats de différentes souches se calcifient avec l'âge. Une étude de Kieffer *et al* a montré que le contenu calcique dans l'aorte thoracique chez des rats Wistar, Wistar Kyoto, Fisher 344 et SHR augmente d'environ 2,5 fois entre l'âge de 6 et 30 mois. Cependant, le ventricule gauche et le foie ne développent pas de calcification (138).

10.4. Modèles de calcification vasculaire *in vivo* liés à l'IRC

L'IRC est un enjeu de santé public mondial du fait de son incidence croissante et du mauvais pronostic des patients lié l'augmentation du risque d'évènements cardiovasculaires. Indépendamment des facteurs de risques traditionnels, le développement des pathologies

cardiovasculaires et de la mortalité est étroitement dépendant de la présence et de la progression de la minéralisation artérielle au cours de l'IRC (139). Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques des calcifications artérielles (intimales et médiales) qui permettront le développement de traitements plus efficaces reposent notamment sur le développement de modèles animaux.

10.4.1. Modèle de rat adénine

L'utilisation d'un régime riche en adénine chez le rat reste un modèle simple qui ne nécessite pas d'avoir recours à une procédure chirurgicale. Les résultats obtenus dans ce modèle sont satisfaisants avec un faible taux de mortalité comparativement aux modèles chirurgicaux. A l'issue d'un mois de régime adénine (0,75%) avec une diminution de la teneur en protéines (de 25 à 2,5%), des dépôts calciques sont observés au niveau de la couche médiane aortique des animaux (140). Cependant, ce régime présente un inconvénient majeur qui est la perte du poids corporel qui peut atteindre 50% (43,141).

L'utilisation de ce modèle entraîne une IRC sévère illustrée par un effondrement de la fonction rénale et des anomalies de l'homéostasie phosphocalcique. Après 4 semaines de régime, une hypercréatininémie et une hyperphosphatémie sont observées avec peu de modification des concentrations plasmatiques de calcium et ce malgré l'apparition d'une hyperparathyroïdie secondaire. A mesure de l'aggravation de l'IRC dans ce modèle, le développement de la calcification vasculaire prend place et progresse sans avoir recours ni à une supplémentation en vitamine D ni à la présence d'une prédisposition génétique (142,143).

10.4.2. Modèle de néphrectomie des 5/6^{ème}

Le modèle de néphrectomie des 5/6^{ème} induit une réduction de 5/6 de la masse totale du rein. La méthode la plus couramment utilisée consiste en deux étapes : d'abord, l'élimination des deux pôles d'un rein (représentant 2/3 du premier rein), suivie, une semaine plus tard, de la néphrectomie complète de l'autre rein. Il a été observé que le modèle 5/6Nx conduit à des niveaux de créatinine sérique en moyenne 2,2 fois plus élevés que ceux des animaux témoins. En l'absence de vitamine D supplémentaire, les rats 5/6Nx présentent, huit semaines après la

chirurgie, des taux de phosphore jusqu'à 2,5 à 4 fois plus élevés que des animaux contrôles, avec un régime alimentaire contenant entre 0,9 et 1,2% de phosphore (144).

Conformément aux directives de l'American Institute of Nutrition, la teneur alimentaire normale en phosphore pour les rats avoisine généralement les 0,3% (en fonction de la méthode de calcul utilisée) (145). Ce modèle se caractérise par une hyperparathyroïdie, avec des études rapportant des augmentations de la PTH allant de 2,4 à 77 fois par rapport à des animaux témoins, bien que les niveaux de calcium dans le sang restent relativement stables.

10.4.3. Modèle d'électrocautérisation/coagulation de souris

En 1983, ce modèle d'IRC a été réalisé pour la première fois chez la souris par électrocoagulation de surface du rein (146). Des années plus tard, le développement de cette technique sur des souris de fonds génétiques différents a permis de mieux favoriser la minéralisation vasculaire dans un contexte d'athérosclérose ou de syndrome métabolique (souris *ApoE*^{-/-} et *Ldlr*^{-/-} respectivement) (147,148). L'électrocoagulation est une approche qui se déroule en deux étapes avec, sur un des deux reins, une électrocautérisation du cortex rénal en laissant les surrénales et le hile intacts. Une semaine après, une néphrectomie du rein restant est induite.

Ce modèle se caractérise par le développement d'une IRC de gravité variable, une hyperparathyroïdie et une augmentation de la phosphatémie, et peut être associé ou pas avec un régime riche en phosphore. Cependant, la nécessité de la procédure chirurgicale reste la principale limite de ce modèle avec des complications entraînant une mortalité proche de 30% des animaux. Ce modèle a été très utilisé pour étudier le rôle de nombreux acteurs de la calcification grâce à l'utilisation de souris transgéniques (*apoE*, *catS*, *féuine A*) et pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

10.4.4. Autres modèles

Nous avons discuté différents modèles de maladie rénale chronique de gravité légère à modérée, qui présentent tous des anomalies des biomarqueurs circulants tels que le calcium, le phosphore, la PTH et la vitamine D ainsi que des altérations osseuses (le modèle

ldlr^{-/-} IRC) qui accélèrent la calcification vasculaire. Cependant, il est important de noter que les modèles d'IRC discutés entraînent généralement une lésion rénale aiguë qui évolue ensuite vers une IRC persistante. Une étude récente menée par Moe *et al* a rapporté le développement de l'IRC au fil du temps chez des rats spontanément diabétiques (SDT) ayant subi une néphrectomie des 5/6^{ème} (149). En suivant un régime riche en phosphore, ces rats développent progressivement une hyperphosphatémie, une hyperparathyroïdie et des problèmes osseux. Toutefois, le degré de calcification aortique médiale était nettement plus sévère chez les rats néphrectomisés de la souche SDT que les rats sauvages. Une autre étude menée par Persy *et al* a démontré, *in vivo* par microtomographie à rayons X à haute résolution, le développement de la calcification chez des rats atteints d'IRC induite par un régime contenant 0,75% d'adénine (0,92% de phosphate et 1% de calcium). Lors du suivi des animaux, ces derniers ont reçu un autre régime supplémenté de 1,6 % de calcium et de 1,03 % ou 1,2 % de phosphate. La technique d'imagerie utilisée dans cette étude est une méthode sensible et reproductible qui permet de quantifier la calcification sans nécessiter d'analyse *ex vivo*, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour la conception d'interventions dans les futures études (150).

Chapitre II – Le rétrécissement aortique calcifié

1. Histologie de la valve aortique

1.1. La situation anatomique de la valve aortique

Un composant du système cardiovasculaire, la valve aortique, se trouve entre l'aorte et le ventricule gauche du cœur. Elle représente le lien entre le système cardiaque et le système vasculaire permettant le passage du sang de façon unidirectionnelle. Par sa fonction de pompe, le cœur est un organe responsable de la circulation sanguine à travers l'organisme. Son rôle est de récolter le sang pauvre en oxygène à partir des veines caves afin de l'envoyer *via* l'artère pulmonaire aux poumons. Après son oxygénation, le sang sera renvoyé vers le cœur par les veines pulmonaires pour être éjecté dans la circulation systémique par le biais de l'aorte.

Fonctionnellement, le cœur se repartit en deux parties. Alors que, le cœur droit assure le transfert du sang appauvri en oxygène, le sang riche en oxygène est éjecté via le cœur gauche. Ces deux parties sont constituées de deux cavités, d'un point de vue morphométrique symétriques, avec le ventricule au niveau inférieur et l'oreillette au niveau supérieur. Afin de permettre la séparation de ces deux compartiments et d'empêcher le reflux sanguin au moment de la contraction ventriculaire (systole ventriculaire), il existe des valves auriculo-ventriculaires à savoir les valves tricuspide et mitrale. Enfin, les valves artérielles, les valves pulmonaire et aortique, séparent les ventricules des artères (pulmonaire et aortique) et empêchent le retour du flux sanguin lors de la relaxation ventriculaire (la diastole ventriculaire) (figure 10).

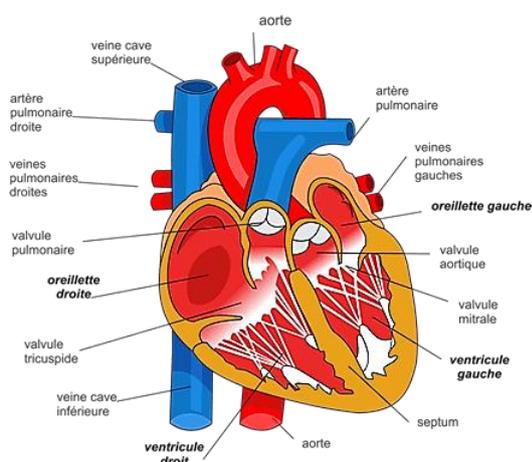


Figure 10 : Le cœur et les valves cardiaques

Coupe cardiaque en vue sagittale, on distingue le cœur droit (à gauche sur le schéma) et le cœur gauche (à droite sur le schéma). Les artères et veines appartenant au cœur droit sont en couleur bleu et celles du cœur gauche sont désignées en rouge (151).

1.2. La valve aortique

La valve aortique et la valve pulmonaire sont identiques d'un point de vue histologique et anatomique en raison de leur origine au cours du développement embryonnaire. Ces valves sont composées de la même façon de 3 feuillets tissulaires aussi appelés les sigmoïdes ou les valvules (figure 2). Ces cuspides sont seulement ouvertes lorsque la pression du sang au sein du ventricule devient supérieure à la pression dans l'artère assurant ainsi le contrôle du flux sanguin de manière unidirectionnelle. D'un point de vue pathologique, un dysfonctionnement des valves artérielles s'observe lors d'un rétrécissement valvulaire appelé sténose, entravant le passage du sang vers l'artère. La sténose de la valve pulmonaire est principalement une maladie qui affecte les enfants présentant une anomalie congénitale de cette valve alors que le rétrécissement aortique est plutôt une pathologie qui touche la population âgée mais elle peut aussi être secondaire à une malformation congénitale (152–154).

Par ailleurs, les valves auriculo-ventriculaires séparent les oreillettes des ventricules ; la mitrale pour le cœur gauche et la tricuspide pour le cœur droit. Comme son nom l'indique, la valve tricuspide se compose de 3 feuillets à l'inverse de la valve mitrale qui n'en possède que deux. Ces valves ne partagent pas la même structure anatomique et structurelle que la valve aortique. En effet, les valves mitrale et tricuspide assurent le passage du sang des oreillettes vers les ventricules de manière passive par un système de pression négative. La présence d'un réseau sophistiqué de cordages tendineux, absent de la valve aortique, empêche le sang de rejoindre le réseau artériel quand il y a une pression exercée sur le sang au cours de la systole. Ce réseau est ancré au niveau du muscle ventriculaire via les muscles papillaires. La contraction de ces muscles induite lors de la contraction ventriculaire maintient les feuillets des valves bien fermés évitant ainsi le passage du sang vers le réseau artériel (figure 11) (155).

En clinique, les anomalies de la valve mitrale et de la valve tricuspide sont moins fréquentes en pathologie mais une insuffisance ou sténose valvulaire est possible. La sténose des valves auriculo-ventriculaires se caractérise par une occlusion du passage sanguin des oreillettes vers les ventricules avec une calcification annulaire (156). En ce qui concerne l'insuffisance de ce type de valves, elle se manifeste par un épaissement des valvules, des modifications structurelles des cordages tendineux et une dilatation de l'anneau fibreux (157).

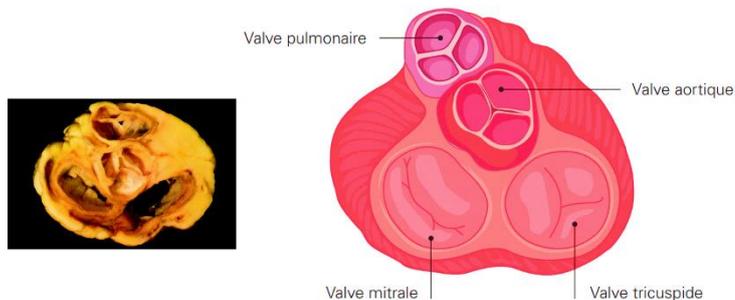


Figure 11 : Anatomie des valves cardiaques

D'après (158).

1.3. La valvulogénèse

La valvulogénèse est un processus complexe durant lequel les cuspidés se développent (159). Elle prend place entre la 5^{ème} et la 8^{ème} semaine du développement embryonnaire. En effet, au cours du 22^{ème} jour, le cœur présente les prémices des futures cavités cardiaques, des veines et des artères. Sa paroi est constituée, au niveau de sa lumière, d'un tube de cellules endocardiques et d'un tube de cellules myocardiques au niveau distal. Une matrice extracellulaire appelée gelée cardiaque permet la séparation des deux tubes. Cette phase de l'embryogenèse est le point de départ de la morphogénèse du cœur également appelée plicature du tube cardiaque primitif et la valvulogénèse est également initiée. Bien que le cœur prenne forme, progressivement la gelée cardiaque se rétrograde pour apparaître seulement au niveau des zones de « transition » : d'une part, au niveau du futur septum interventriculaire et d'autre part, au niveau des bourgeons endocardiques. Ces bourgeons (bourrelets endocardiques) sont les prémices des valves cardiaques.

Les bourgeons qui se trouvent au niveau du sillon atrio-ventriculaire permettent la formation des valves auriculo-ventriculaires. A l'inverse, ceux localisés au niveau du bulbe artériel sont responsable de la formation des valves artérielles (160) (figure 12). Il est important de savoir que les phases précoces du développement des valves artérielles et celles des valves auriculo-ventriculaires sont similaires et simultanées. Les étapes tardives du développement des valves auriculo-ventriculaires impliquent la construction de piliers tendineux alors que les valves artérielles en sont dépourvues (159). De par la thématique de cette thèse, seule la formation complète de la valve aortique sera abordée.

La valve aortique est issue de la maturation et la convergence des bourgeons endocardiques. Ce processus comprend 4 étapes clés à savoir : l'épaississement, la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules interstitielles de valves (VICs),

l'excavation des cuspides en formation et, enfin, la structuration de la MEC en 3 couches histologiques différentes (159,161). L'épaississement des bourgeons endocardiques fait suite à l'initiation de la transition endothélio-mésenchymateuse (EMT, Endothelial Mesenchymal Transition) des cellules endocardiques. En réponse à des signaux distincts provenant du myocarde, le phénomène de différenciation cellulaire est induit.

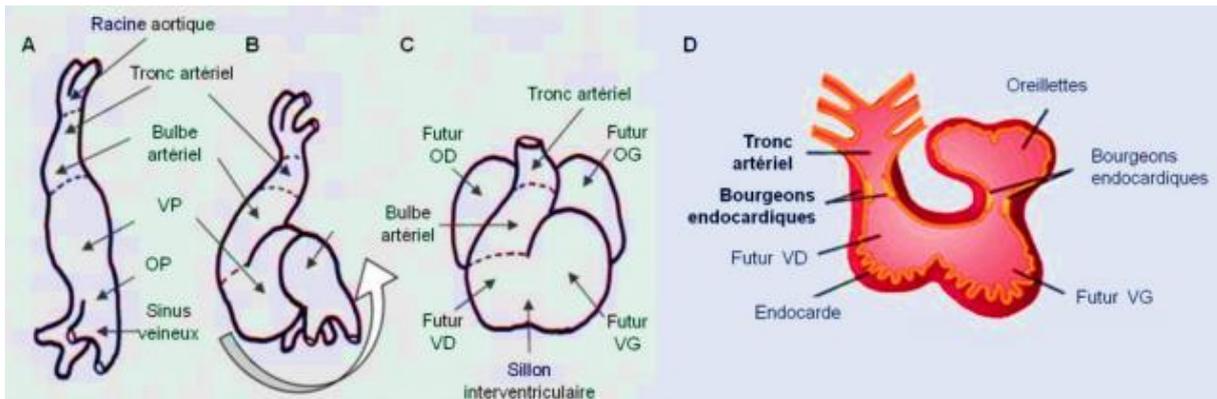


Figure 12 : Représentation schématique de la morphogénèse cardiaque

(A) : Tube cardiaque primitif. (B) : Plicature du tube cardiaque primitif. (C) : Vue frontale de la morphologie du cœur une fois la plicature achevée. (D) : Vue sagittale de la morphologie du cœur une fois la plicature achevée. Légende : VP : ventricules primitifs, OP : oreillettes primitives, OD : oreillette droite, OG : oreillette gauche, VD, ventricule droit et VG : ventricule gauche. D'après (160).

Suite à la perte des jonctions d'adhésion cellulaire entre les cellules endocardiques, l'EMT prend place. De ce fait, ces cellules vont adhérer à la MEC et développer un phénotype mésenchymateux. Ces dernières vont alors, après dégradation de la lame basale, migrer au sein du bourgeon endocardique. Progressivement, ces cellules mésenchymateuses rejoignent le centre du bourgeon endocardique et se mettent à produire plus de la MEC (159,161) (figure 13).

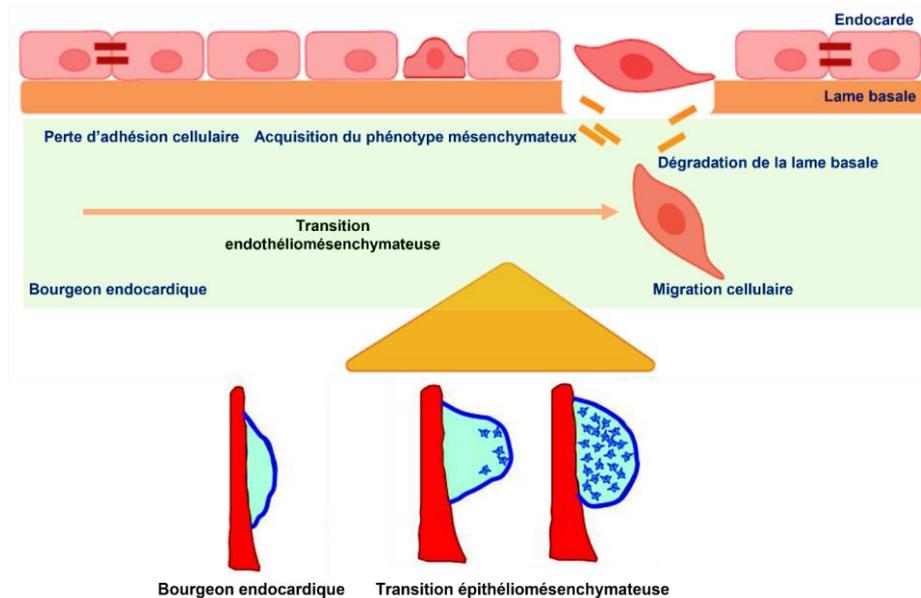


Figure 13 : Transition endothélio-mésenchymateuse

D'après (159).

Par la suite, les cellules mésenchymateuses se différencient en VICs. Durant cette phase, les cellules mésenchymateuses deviennent des cellules similaires aux myofibroblastes. En parallèle, l'excavation des cuspidés correspondant en un amincissement de celles-ci est induite par 2 mécanismes distincts : l'apoptose et l'inhibition de la prolifération des cellules mésenchymateuses. Enfin, par la synthèse de collagène, de protéoglycanes et d'élastine par les VICs, la structuration de la MEC de la valve aortique s'organise pour permettre la maturation des feuillets valvulaires aortiques et les rendre résistants aux différentes formes de stress hémodynamique auxquels ils seront confrontés en particulier les forces de cisaillement et les contraintes de pression (figure 14).

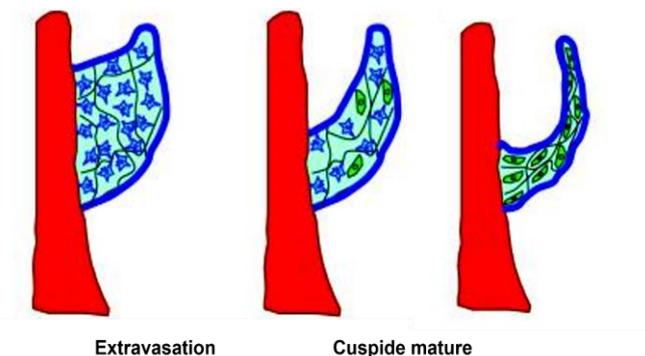


Figure 14 : Maturation de la valve aortique

D'après (159).

A ce niveau, les feuillets de la valve sont complets et matures. Cependant, la valve aortique n'est pas encore achevée, d'un point de vue anatomique et morphologique. Le « wedging » est un processus par lequel la valve aortique acquiert sa morphologie définitive. Il correspond à l'encastrement de la voie efférente constituée du bulbe et du tronc artériel permettant la formation du septum continu entre la future artère pulmonaire et la future aorte. En effet, la formation du septum dit continu s'achève au moment où les 3 septums (celui du bulbe artériel, l'aortique-pulmonaire et celui du tronc artériel) s'unissent. A l'issue de cette fusion, l'aorte s'enroule tout autour de l'artère pulmonaire et la valve aortique tricuspide est ainsi formée (162).

Il existe parfois une malformation congénitale de la valve aortique. Elle peut se manifester cliniquement par la présence d'une bicuspidie (1 à 2% de la population) ou dans d'autres rares cas d'unicuspidie (2 000 cas dans le monde) (163) ou encore plus rarement de quadricuspidie. En ce qui concerne l'origine de la bicuspidie, des études précédentes avaient suggéré que la fusion des bourgeons endocardiques lors des phases tardives du développement des cuspidés serait en cause. En revanche, les mécanismes impliqués dans les autres anomalies congénitales de la valve aortique sont encore non élucidés (164).

1.4. Structure histologique

La valve aortique possède une structure histologique similaire aux autres valves cardiaques. Une valve aortique saine est avascularisée en raison de sa petite épaisseur (inférieure à 1 mm). De ce fait, l'endothélium est chargé de l'oxygénation, de l'apport des nutriments ainsi que de l'élimination des déchets cellulaires au sein de la valve (165). Comme abordé dans la section précédente, les cuspidés ont une structure trilamellaire composée de la ventricularis, de la spongiosa et enfin de la fibrosa. Histologiquement, ces trois couches sont différentes car chacune d'entre elles se caractérise par sa propre MEC. Latif *et al*, ont rapporté que tous les composants de la MEC de la valve à travers ses propriétés mécaniques et ses interactions avec les cellules de la valve, jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie valvulaire (166). Bien que les composants de la MEC soient différents dans cette triade de couches, il est à noter que les VICs y sont toujours présentes. En effet, la valve aortique possède deux types de voie de mécano-transduction à savoir la voie centralisée et la voie décentralisée car elle doit s'adapter à son environnement hémodynamique particulier (167). La voie centralisée a pour fonction de réagir à des fluctuations des forces externes à la valve. Les

interactions entre les cellules et entre les cellules et la MEC vont permettre la transmission de l'information et l'activation des voies de signalisation distinctes afin de s'adapter aux modifications hémodynamiques. Quant à la voie décentralisée, elle a pour but de s'adapter à toutes modifications de force interne à la valve. De ce fait, les interactions entre les cellules valvulaires et avec les éléments de la MEC vont contribuer à la détection et la mesure des forces de contraction et de tension exercées au sein de la valve. Au moment où ces forces sont modifiées, les liaisons existantes entre le noyau et le cytoplasme cellulaire subissent une déformation à l'origine d'un switch rapide du profil d'expression génique (166,168).

1.4.1. L'endothélium

Composé de VECs, l'endothélium constitue une surface de contact non-thrombotique avec le sang (figure 15) (169). Contrairement à l'endothélium vasculaire, l'endothélium de la valve aortique est perpendiculaire au flux sanguin. Il est, de ce fait, soumis à des forces de cisaillement et de pression similaires à celles observées aux différentes bifurcations du système vasculaire. Il est à noter que l'endothélium de la face ventriculaire présente des particularités différentes de celui qui constitue la face aortique comme cela sera évoqué plus loin dans ce chapitre (166).

1.4.2. La ventricularis

La ventricularis est localisée sur la face aortique des feuillets valvulaires. Elle représente entre 20 % et 30 % de l'épaisseur valvulaire normale. Cette couche se trouve en contact direct avec le flux aortique pulsatile et elle est composée de fibres de collagène, de protéoglycanes, de fibronectine et surtout de fibres élastiques (figure 15) (166). La prédominance des fibres d'élastine lui confère une forte flexibilité/ élasticité face aux contraintes de cisaillement unidirectionnelles (169).

1.4.3. La spongiosa

La spongiosa est essentiellement constituée de fibres de collagène, de fibronectine et surtout de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes (GAGs). Elle représente la couche médiane de la valve représentant 29 % et 35 % de son épaisseur (figure 15) (166). Cette couche est dotée de propriétés élastiques grâce à la présence d'interactions entre les fibres de collagène, les GAGs et les protéoglycanes. De ce fait, la valve acquiert plus de résistance aux différentes pressions auxquelles elle est soumise comme celles subies au moment de la systole ventriculaire. La spongiosa a, la capacité d'amortir les contraintes associées aux forces de pression grâce à la présence des charges négatives des chaînes latérales des protéoglycanes. Ces derniers, peuvent aussi interagir avec les VICs pour transmettre l'information sur les modifications de ces contraintes (169).

1.4.4. La fibrosa

La fibrosa est majoritairement composée de fibronectines et de fibres de collagène. Elle est située face à l'aorte et représente entre 41 % et 45 % de l'épaisseur d'une valve normale (figure 15). Les fibres de collagène permettent à la valve aortique une forte résistance mécanique et un maintien optimal de l'intégrité tissulaire (166). Ainsi, cette couche représente la colonne vertébrale du tissu valvulaire. Bien que soumise à une plus faible contrainte de cisaillement que la ventricularis, elle présente une rigidité bien plus forte. Il est à noter que lors de la diastole, la pression sanguine chute et une contrainte de cisaillement oscillatoire est observée. C'est pour résister à ce type de contrainte que la fibrosa a besoin d'une plus grande rigidité que la ventricularis (169).

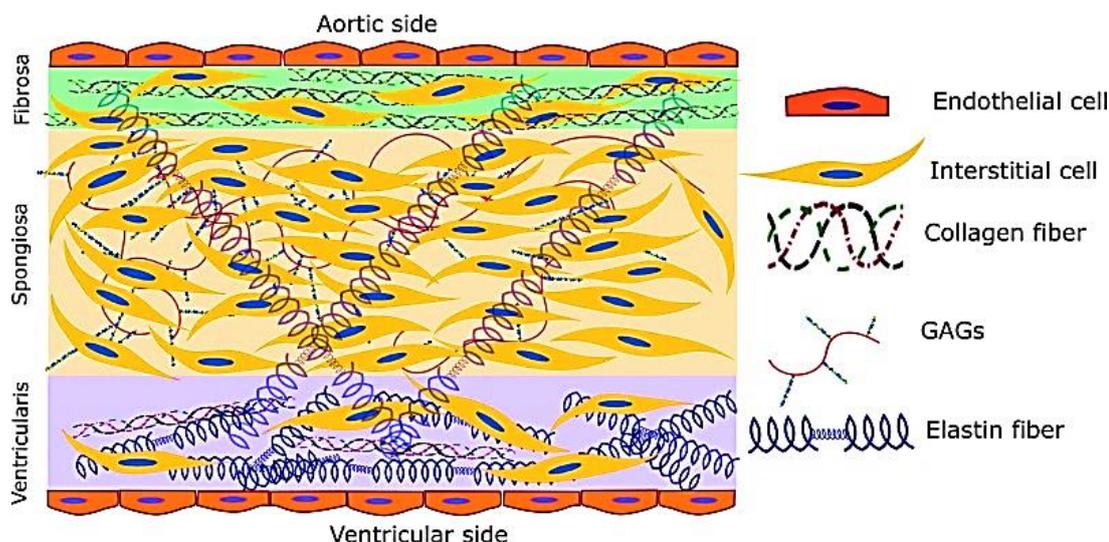


Figure 15 : les différentes couches de la valve aortique

La couche fibrosa, orientée vers l'aorte, est principalement constituée de collagène, avec quelques rares fibres élastiques. Les cellules interstitielles se répartissent dans toutes les couches de la valve, à l'exception de l'endothélium. La couche spongiosa, localisée au centre, abrite la majorité des cellules interstitielles ainsi que des glycosaminoglycane et quelques fibres élastiques. Les fibres élastiques recouvrent à la fois la spongiosa et la face ventriculaire, tournée vers le ventricule gauche. La couche ventricularis contient une quantité plus importante d'élastine que les autres couches, ainsi qu'une faible proportion de fibres de collagène (170).

2. Les différents types cellulaires composant la valve aortique

Les feuillets de la valve aortique contiennent deux types cellulaires, les cellules valvulaires interstitielles (VICs) qui sont tapissées d'une monocouche de cellules valvulaires endothéliales (VECs) présentes sur la face ventriculaire et aortique de la valve.

2.1. Les cellules valvulaires endothéliales (VECs)

Les VECs expriment le facteur de von Willebrand (vWF) comme toutes les cellules endothéliales. Elles jouent un rôle important dans le maintien et la régulation de l'homéostasie valvulaire. Ces cellules sont capables de communiquer avec les VICs sous-jacentes et de maintenir une surface de contact avec le sang non thrombotique (171). Les VECs s'alignent en position perpendiculaire à la direction de l'écoulement du sang. Cette caractéristique est

associée à une réorganisation du cytosquelette à l'inverse des cellules endothéliales vasculaires qui sont alignées parallèlement au flux sanguin.

Cette particularité d'orientation des VICs leur permet de détecter le sens de l'écoulement sanguin et l'activation de nombreux mécanismes de signalisation en réponse aux variations des contraintes de cisaillement (172). De plus, les mécanismes impliqués dans le processus de calcification au niveau vasculaire sont différents de ceux observés au niveau valvulaire notamment à l'échelle de l'expression génique où les VECs expriment davantage des gènes chondrogéniques alors que les cellules endothéliales vasculaires expriment plus de gènes pro-ostéogéniques (169). Les VECs jouent aussi un rôle important dans la régulation des VICs en transmettant les contraintes mécaniques. Certains facteurs identifiés libérés par les VECs comprennent l'oxyde nitrique (NO), les prostanoïdes et l'endothéline-1 (173,174). Ceux-ci vont moduler la fonction des VICs en utilisant des signaux de communication paracrine. Dans des modèles en trois dimensions des feuillets valvulaires aortiques, où les VECs et les VICs sont co-cultivées et soumises à un flux luminal, les VECs sont capables de s'aligner perpendiculairement au flux. En revanche, les VICs cultivées de manière indépendante par rapport aux VECs sous l'effet du flux expriment fortement la vimentine et, dans une moindre mesure, l' α -SMA par rapport aux cultures combinées de VICs et de VECs. Les VECs diminuent la prolifération des VICs, augmentent la synthèse protéique en réponse aux contraintes de cisaillement, et réduisent la perte de GAGs sous l'effet du flux. Ces interactions entre les VECs et les VICs sont fondamentales pour la réponse de la valve aortique face à une lésion hémodynamique et pour la préservation de l'intégrité du tissu valvulaire (175).

2.2. Les cellules valvulaires interstitielles (VICs)

Lors du développement embryonnaire, les VICs sont issues des cellules souches embryonnaires et mésenchymateuses par l'EMT (176). Chez l'adulte, les VICs sont réparties selon cinq phénotypes à savoir : les progéniteurs des cellules endothéliales et mésenchymateuses, les VICs dérivées des cellules souches (pVICs), les VICs quiescentes (qVICs), les VICs activées (aVICs) et les VICs ostéoblastiques (obVICs). Cette variété phénotypique des VICs est essentielle au bon fonctionnement valvulaire. Cependant, la dérégulation de ces changements phénotypiques est associée au développement de la calcification valvulaire (177).

2.2.1. Les VICs progénitrices (pVICs)

Les pVICs sont les cellules de la valve aortique les moins décrites. Elles sont constituées d'une population cellulaire plus au moins hétérogène. Les pVICs sont issues de la moelle osseuse et peuvent être recrutées à partir du sang circulant (178). En réponse à certaines lésions valvulaires, les pVICs peuvent se différencier en cellules obVICs participant ainsi à la formation des dépôts calciques au niveau de la valve aortique (179).

2.2.2. Les VICs quiescentes (qVICs)

Les VICs quiescentes sont des cellules dites « au repos » au niveau de la valve aortique chez l'adulte. Ces cellules assurent le bon fonctionnement de la valve et le maintien de sa structure en favorisant le renouvellement continu de la MEC (176). Bien que les qVICs puissent s'activer en aVICs lors d'une lésion valvulaire, elles sont capables de se différencier en obVICs en présence de médiateurs et facteurs ostéochondrogéniques. Elles participent ainsi au développement et à la progression de la calcification valvulaire (178).

2.2.3. Les VICs activées (aVICs)

Les aVICs sont très peu abondantes à l'état physiologique au niveau de la valve aortique. En réponse à des lésions valvulaires, certains signaux cellulaires sont générés et favorisent la transformation des qVICs quiescentes en aVICs. Ces dernières se caractérisent par leur expression d'un isoforme cytosquelettique de l'actine (smooth muscle actin ou SMA), au contraire des qVICs qui ne l'expriment pas (180).

Par ailleurs, notre connaissance de la physiopathologie des cellules inflammatoires (notamment les macrophages, les cellules spumeuses et les lymphocytes) présentes au sein de la valve au cours du RAC est actuellement limitée. Il est possible que ces cellules soient recrutées dans la valve grâce à une régulation positive de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et les leucocytes. Une fois localisées dans la valve, ces cellules pourraient sécréter des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance et des enzymes

protéolytiques, contribuant ainsi de manière collective au processus d'activation des VICs. L'activation des VICs est également associée à une augmentation de leur migration et de leur prolifération qui est essentiellement régulée par le NO et le facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF-2) (180).

Par ailleurs, il est décrit dans la littérature une augmentation de la destruction de la MEC qui accompagne l'activation des VICs. La dégradation de la MEC est notamment due à un déséquilibre entre des MMPs et leurs inhibiteurs tissulaires (TIMPs) en faveur des MMPs. Il a été démontré que l'expression des gènes des MMPs (*MMP-1* et *MMP-2*) est augmentée par certaines cytokines, notamment IL1 β et TNF α dans des aVICs mises en culture (181,182).

A la fin de la réparation tissulaire, au niveau de la valve après un épisode inflammatoire, les aVICs subissent une apoptose. La dérégulation de ce processus apoptotique aboutit à un renouvellement continu de la MEC entraînant ainsi un remodelage matriciel non physiologique et une fibrose valvulaire pathologique. Enfin, l'ensemble de ces événements conduit à l'initiation de l'angiogenèse, maintient l'inflammation et favorise *in fine* le développement de la calcification valvulaire (177) (183) (184).

2.4.4. Les VICs ostéoblastiques (obVICs)

Les obVICs sont impliquées dans la régulation des processus de l'ostéogenèse et de la chondrogenèse. Ces cellules se caractérisent par l'expression de différents marqueurs de la différenciation ostéoblastique tels que l'OPN, l'ostéocalcine (OCN), la PAL et les protéines morphogéniques osseuses (BMP). Malgré l'expression de cet ensemble de marqueurs ostéochondrogéniques, les obVICs ne sont pas de vrais ostéoblastes et ils n'ont pas besoin avant d'atteindre ce profil d'expression génique d'un passage préalable par un stade myofibroblastique (en fait de devenir des aVICs) (185). En revanche, il a été décrit que la différenciation ostéoblastique des VICs est dépendante de l'activation des voies de signalisation du BMP et de Notch1 au cours de la calcification valvulaire (176) (25).

2.3. La physiologie de la valve aortique

Il est important de rappeler que le bon fonctionnement de la valve aortique est essentiel afin d'assurer le passage unidirectionnel du flux sanguin. En effet, lors de la contraction systolique, la pression intraventriculaire du sang entraîne l'ouverture (à peu près 100 000 fois/ jour) passive de la valve aortique (186). En diastole ventriculaire, les cuspidés de la valve aortique se ferment en raison de la chute de la pression sanguine. L'appareil valvulaire est composé de 6 éléments : les cuspidés, le site d'ancrage des cuspidés, les triangles inter-cuspidés, le sinus de Valsalva, la jonction sino-tubulaire et enfin l'anneau aortique. Plus précisément, les cuspidés sont physiologiquement présentes au nombre de 3. Anatomiquement, les cuspidés forment des feuillets fins semi-lunaires possédant une base ancrée en forme de « U » au niveau de la paroi de l'aorte. Alors qu'il existe une barrière physique entre le ventricule gauche et l'aorte, les cuspidés de par leur capacité à assurer le passage du sang selon un sens unique, forment ce qu'on appelle une jonction hémodynamique

Leur site d'ancrage, une structure fibreuse épaisse, a une forme de couronne dont les 3 branches verticales remontent aux commissures des cuspidés. Sous ces commissures se trouvent les triangles inter-cuspidés qui, histologiquement, correspondent à une portion de la paroi aortique amincie et, du point de vue hémodynamique, à une extension de la voie d'éjection du ventricule gauche. Les sinus de Valsalva sont, quant à eux, des renflements de la racine aortique dont chacun fait face à une cuspidé. Deux de ces sinus servent d'ancrage aux artères coronaires droite et gauche permettant ainsi de distinguer chaque cuspidé, nommées cuspidé coronaire droite, gauche et non coronaire. Structure tubulaire constituée de la partie distale des sinus de Valsalva et des commissures, la jonction sino-tubulaire sépare la racine aortique de l'aorte ascendante. Enfin, bien que n'ayant pas d'identité anatomique ou histologique réelle, l'anneau aortique forme une structure circulaire virtuelle dont la circonférence est définie par le point d'ancrage le plus bas de chaque cuspidé (187).

2.3. Environnement hémodynamique

En raison de sa localisation anatomique, la valve aortique est exposée à différents types de contraintes hémodynamiques. Afin qu'elle puisse s'adapter à ces contraintes, la valve est dotée d'une structure et d'une anatomie particulière. Elle est soumise à ces forces de façon constante et simultanée au moment de son ouverture et de sa fermeture à chaque cycle

cardiaque. La contrainte de cisaillement, liée au flux sanguin, expose l'endothélium de la valve aortique à des frottements successifs avec les éléments composants du sang. On distingue son apparition au moment de la systole du côté ventriculaire et de la face aortique lors de la diastole (188). De part et d'autre de la valve aortique, cette force est très différente puisque, d'une part, la direction du flux sanguin exercé sur les faces n'est pas identique et, d'autre part, la vitesse du sang est plus importante pendant la systole. En effet, la contrainte de cisaillement est élevée et perpendiculaire au niveau de l'endothélium du côté ventriculaire mais elle est oscillatoire sur la face aortique (189).

De plus, la présence des artères coronaires dans les sinus de Valsalva entraîne une perturbation du flux sanguin appliqué sur les faces aortiques des cuspidés coronaires droite et gauche (190). Il est important de savoir que la présence de ce flux sanguin turbulent élevant les forces de cisaillement appliquées sur les cuspidés coronaires n'entraîne pas une prédisposition à la sténose aortique. A contrario, la cuspidé la plus concernée par le développement de la calcification est la cuspidé non coronaire qui semble la moins adaptée aux perturbations du flux sanguin (190,191). D'autre part, même si l'ouverture et la fermeture de la valve aortique dépendent des différences de pression entre le ventricule gauche et l'aorte, celle-ci possède une force intrinsèque que l'on observe lors de sa fermeture.

3. Epidémiologie et étiologie du rétrécissement aortique

Le rétrécissement aortique est une maladie caractérisée par un dysfonctionnement de la valve aortique. C'est la valvulopathie la plus fréquente qui touche les pays les plus développés. C'est une pathologie du sujet âgé dont le risque augmente au cours du vieillissement affectant ainsi 25% à 30% des personnes de plus de 65 ans et environ 50% des personnes de plus de 85 ans. Au cours des deux dernières décennies, sa prévalence est estimée entre 2% et 7% faisant de cette pathologie un enjeu majeur de santé publique (192). Dans la majorité des cas, le rétrécissement aortique découle d'une altération de la valve aortique elle-même. Cependant, dans des situations plus rares, il peut également être provoqué par des anomalies situées au-dessus de cette valve (rétrécissement aortique sous-valvulaire) ou en dessous d'elle (rétrécissement aortique sous-valvulaire).

3.4. Le rétrécissement aortique d'origine dégénérative

L'étiologie du rétrécissement aortique est le plus souvent dégénérative (calcifié) et appelé rétrécissement aortique calcifié ou RAC. Le RAC ou maladie de Mönckeberg représente la forme du RAC la plus souvent retrouvée chez les personnes âgées, généralement de plus de 70 ans. Il survient en raison d'un épaissement au niveau de la matrice extracellulaire en plus de la progression de la calcification des feuillets valvulaires. La rigidité valvulaire générée est à l'origine de modifications des contraintes hémodynamiques qui à leur tour aggravent au fil du temps les lésions valvulaires préexistantes (193).

3.5. La bicuspidie congénitale

La bicuspidie aortique se positionne comme la malformation cardiovasculaire congénitale la plus fréquente, se manifestant dans 0,5 à 2% des naissances vivantes (194). Les individus porteurs d'une bicuspidie aortique présentent une prédisposition à développer des complications telles qu'une endocardite infectieuse, une insuffisance aortique, et/ou une sténose aortique. La présence d'une valve aortique bicuspide peut également être corrélée à une dilatation de la racine aortique ou de l'aorte ascendante, ainsi qu'à une coarctation de l'aorte.

Cette malformation congénitale est ainsi retrouvée chez 20 à 50% des patients atteints de RAC. Sa prévalence familiale s'élève à 9% et par conséquent, les parents au premier degré des individus porteurs de cette malformation doivent subir une échocardiographie à des fins de dépistage. Le diagnostic d'une valve bicuspide, même chez un patient avec une fonction valvulaire normale, revêt une importance capitale pour le suivi, car ces valves bicuspides sont associées à une aortopathie favorisant une dilatation graduelle de la racine aortique ou de l'aorte ascendante et, ultimement, la formation d'anévrismes. Bien que les taux de complications puissent varier considérablement selon les études, en général, une dilatation peut toucher jusqu'à 56% des individus âgés de moins de 30 ans (195).

3.6. Le rétrécissement aortique d'origine rhumatismal

Le rhumatisme articulaire aigu constitue, dans les pays où les systèmes médicaux sont défectueux, la cause prédominante de RAC dans toutes les tranches d'âge. Sa prévalence est de plus en plus rare dans les pays occidentaux du fait de l'amélioration de la prise en charge

du rhumatisme articulaire. Il est issu des complications d'épisodes inflammatoires dus à l'infection par le streptocoque pyogène *Streptococcus β-hémolytique du groupe A* (193).

On distingue deux formes de RAC provenant du rhumatisme articulaire aigu :

- Le rétrécissement aortique supra-avalvulaire : engendré par une fine membrane ou une constriction hypoplasique congénitale située juste au-dessus des sinus de Valsalva, est peu fréquent. Une variante inhabituelle de ce rétrécissement aortique supra-avalvulaire est liée à des traits faciaux distinctifs (comme un front élevé et large, un hypertélorisme, un strabisme, un nez en forme de trompette, un sillon sous-nasal étendu, une bouche large, des anomalies dentaires, des joues proéminentes, une micrognathie et des oreilles basses). Lorsqu'elle est combinée avec une hypercalcémie idiopathique se produisant durant la petite enfance, cette forme est désignée sous le nom de syndrome de Williams.
- Le rétrécissement aortique sous-avalvulaire, résultant d'une membrane congénitale ou d'un anneau fibreux positionnés juste en dessous de la valve aortique, est également peu fréquent (196).

3.7. Le RAC et l'insuffisance rénale chronique (IRC)

Il existe une incidence accrue du RAC chez les patients en stade terminal d'IRC en comparaison à la population générale. Des études précédentes avaient souligné l'accélération de la progression du RAC lors de l'IRC du fait de la présence d'un environnement urémique, hypercalcémique et hyperphosphatémique qui augmente le risque de formation des calcifications cardiovasculaires (197,198).

4. Les facteurs de risque du RAC

La sténose aortique et l'athérosclérose partagent des facteurs de risque communs. Le développement de la sténose aortique est en effet lié aux facteurs de risque traditionnels notamment l'âge, le sexe masculin, le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète mais également à

d'autres facteurs tels que des concentrations circulantes élevées de la lipoprotéine a Lp(a) dont le rôle physiopathologique a récemment été démontré (192).

Une composante génétique est également associée au développement du RAC comme a pu le démontrer Grag *et al* avec l'impact de variants du gène *NOTCH1* qui représentent un caractère héréditaire dans la bicuspidie valvulaire aortique congénitale (199). Le gène de la vitamine D, et notamment la présence de mutations au niveau de l'allèle B, pourrait également être impliqué dans le développement du RAC. La prédisposition génétique au développement du RAC regroupe d'autres gènes représentant des facteurs de risque de cette pathologie tels que le gène codant pour le récepteur alpha des œstrogène ($ER\alpha$), l'apolipoprotéine E ou encore le facteur de croissance transformant bêta ($TGF\beta$).

5. Généralités et développement du RAC

Le RAC ou sténose aortique (SA), est défini comme étant le rétrécissement de la surface fonctionnelle de la valve aortique. Bien qu'en France, on parlera plus volontiers de RAC, le terme Sao, aortic stenosis en anglais, est communément utilisé dans les publications internationales. Cette pathologie est d'autant plus sévère que la surface fonctionnelle de la valve est rétrécie. Ainsi, la valve s'avère incapable d'assurer le passage unidirectionnel du sang du fait de sa rigidification qui crée une entrave pour le passage du flux sanguin lors de la systole et qui entraîne lors de sa fermeture en diastole, un retour du flux sanguin vers le ventricule gauche (figure 16).

Sur le plan physiopathologique, le RAC a été longtemps considéré comme un processus de dégénérescence passif de la valve aortique. Cette pathologie est fréquemment dénommée « atherosclerosis-like » puisque sa physiopathologie est quasiment similaire à celle de l'athérosclérose. Ce processus actif comprend 4 étapes à savoir : l'inflammation, la fibrose, la néo-angiogenèse et la calcification (200). Le RAC est une maladie progressive se caractérisant par une longue phase de latence appelée sclérose aortique. Issue du grec sklêros signifiant dur, la phase de sclérose consiste en un épaissement progressif de la valve aortique conduisant à sa rigidification et, progressivement, à la réduction de sa surface fonctionnelle. Cette phase de latence est très souvent asymptomatique car elle induit peu d'effet sur le passage du flux sanguin. Néanmoins, comme Nightingale *et al*, le rapportaient en 2005, la sclérose

aortique n'est pas un « innocent murmure » mais un marqueur de risque cardiovasculaire majeur car sa présence s'accompagne d'un risque d'infarctus du myocarde dans les 5 ans suivant sa découverte de l'ordre de 50% (201). Le RAC est initié quand la valve aortique n'est plus capable de jouer son rôle et ce par l'induction des 4 processus précédemment décrits.

Il est à noter qu'il existe 4 stades différents du RAC, établis sur la base des critères cliniques et définis comme suit (154) :

- le stade A correspondant à la sclérose aortique, précurseur asymptomatique du RAC, ou à la bicuspidie aortique,
- Le stade B, progression légère à modérée de la sténose aortique.
- Le stade C, RAC sévère mais néanmoins asymptomatique.
- Le stade D, RAC sévère et symptomatique.

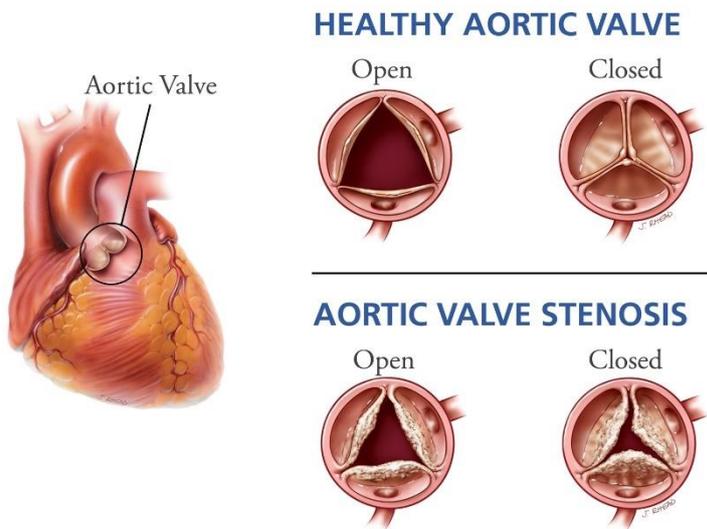


Figure 16 : Valve aortique saine et sténosé

D'après (202).

6. Diagnostic du RAC

6.4. Signes cliniques

Le diagnostic du RAC est systématiquement tardif en raison de l'absence de symptômes pendant une très longue période chez les patients. Bien qu'il soit une pathologie lentement progressive, le pronostic des patients symptomatiques (stade D), s'ils ne bénéficient

pas d'un remplacement valvulaire, est très mauvais avec une mortalité atteignant 80% après 2 ans. L'ensemble des signes cliniques survenant sont :

6.4.4. L'angor

L'angor ou angine de poitrine, désigne des douleurs au niveau thoracique qui apparaissent généralement à l'effort et au stress et sont similaires à celles des coronaropathies.

6.4.5. La dyspnée

La dyspnée ou l'essoufflement à l'effort est le symptôme le plus fréquent de la sténose aortique. Elle est générée essentiellement en raison de l'incapacité du cœur à maintenir un débit cardiaque nécessaire à l'effort.

6.4.6. La lipothymie

La lipothymie ou le malaise lipothymique est une sensation passagère de malaise sans aucune perte de connaissance contrairement à la syncope qui est une perte totale de connaissance. Ces deux sortes de malaise traduisent l'incapacité du cœur au cours de l'effort à accroître le volume d'éjection du ventricule gauche aboutissant à une vasodilatation des artères périphériques et donc une hypotension et une baisse de la perfusion au niveau cérébral.

6.5. Exploration échocardiographie

L'échocardiographie couplée au doppler reste l'examen d'imagerie de choix dans le diagnostic et la surveillance des maladies valvulaires. Il s'agit d'une technique d'imagerie cardiaque non-invasive utilisée afin de mesurer le degré de sévérité du RAC. Cette évaluation dépend d'un ensemble de critères échocardiographiques et notamment la mesure du gradient

moyen transvalvulaire, de la vitesse maximale du flux sanguin à travers la valve aortique et du calcul de la surface valvulaire aortique.

6.5.4. La surface valvulaire aortique

Chez l'adulte, la valeur d'une surface valvulaire normale est comprise entre 3 et 4 cm². Lors de la sténose aortique et en raison de la calcification progressive de la valve, la surface de valvulaire diminue et peut-être inférieure à 1 cm². Grâce à l'échodoppler, la surface valvulaire est obtenue au moyen de la formule suivante :

$$A_2 = A_1 \times V_1 / V_2$$

Où : A_2 (la surface valvulaire aortique) est égale au produit de A_1 (l'aire de la chambre de chasse du ventricule gauche) par V_1 (la vitesse du flux sanguin au niveau de la sortie du ventricule gauche) et divisée par V_2 (la vitesse du flux sanguin valvulaire aortique) (154,203).

6.5.5. Le pic de vitesse (AoVmax)

Le pic de vitesse est défini par la vitesse maximale de l'écoulement sanguin mesurée au niveau de la valve aortique. En coupe apicale et par doppler continu, l'AoVmax est mesurée. La valeur obtenue permet de définir une sténose aortique quand elle est supérieure à 2,5 m/s et quand la vitesse maximale est au-dessus de 4 m/s on parle d'une sténose aortique sévère. En condition physiologique l'AoVmax est inférieure à 1 m/s (203).

6.5.6. Le gradient moyen transvalvulaire

Par définition, le gradient moyen transvalvulaire est la différence de pression qui existe en phase systolique entre le ventricule gauche et l'aorte. Il est représenté par l'équation de Bernoulli :

$$\Delta P = 4v^2$$

Où v est obtenue par la mesure en doppler des vitesses aortiques moyenne (AoV_{moy}) ou maximale (AoV_{max}). Il est également possible de mesurer en doppler le gradient moyen (AoG_{moy}) et selon les valeurs obtenues, le stade de la sténose aortique est déterminé. En absence de RAC, le gradient de pression entre le ventricule gauche et l'aorte est assez faible. Cependant, ce gradient moyen est supérieur à 40 mmHg en présence d'un obstacle à l'éjection ventriculaire gauche témoignant d'une sténose aortique serrée (203) (154).

6.5.7. Autres manifestations échocardiographiques

L'hypertrophie ventriculaire gauche est une conséquence majeure du RAC. Elle est compensatrice et a pour but de normaliser les contraintes par l'épaississement des parois ventriculaires. Son évaluation est effectuée par échocardiographie en mesurant l'épaisseur du septum interventriculaire et la paroi postérieure du ventricule gauche. Elle s'accompagne d'une dysfonction diastolique caractérisée par une diminution de la capacité de remplissage du ventricule gauche mais son retentissement sur la fonction systolique est plus tardif (évaluée par la mesure de la fraction d'éjection) (203).

6.6. Physiopathologie

D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'athérosclérose est définie par « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la média ». De façon similaire, le RAC débute par l'accumulation de lipides avec pour conséquence une réaction inflammatoire locale. Ce processus inflammatoire conduit essentiellement à l'installation d'une fibrose du tissu valvulaire (sclérose) suivie de sa calcification à l'origine de la sténose. Au fur et à mesure, le tissu valvulaire aortique devient plus épais. Les cellules valvulaires présentes alors en très grand nombre se retrouvent en souffrance par manque de nutriments et d'oxygène. Ainsi, divers processus physiopathologiques se mettent en place et se développent tels que l'inflammation, la fibrose et la calcification (169).

7. Mécanismes physiopathologiques

Il est important de rappeler que les premiers mécanismes impliqués dans la physiopathologie du RAC sont principalement déclenchés dans des conditions de réparation tissulaire contrôlée. En effet, la valve aortique et, en particulier, sa couche endothéliale peut par, les nombreuses forces hémodynamiques qu'elle subit, être endommagée. L'inflammation consécutive a alors pour objectif de réparer le tissu lésé, essentiellement par l'activation de qVICs. Lorsque cette réparation tissulaire est achevée, l'inflammation est alors résorbée et les aVICs éliminées par apoptose. La perte de contrôle de ces mécanismes a pour conséquence le développement de la sclérose puis de la sténose aortique (204).

La baisse progressive de la surface valvulaire fonctionnelle est à l'origine des altérations observées au niveau hémodynamique contribuant ainsi à l'amplification du stress exercé sur la valve. Avec le renforcement des perturbations hémodynamiques, la valve perd sa capacité à résister à ce stress, d'où l'installation et la progression de l'inflammation, de la fibrose, de la néo-angiogenèse et la formation de calcifications. Par ailleurs, dans le cadre du RAC sévère, les agressions répétées de l'endothélium constituent un milieu pro-agrégant. Il n'est donc pas rare d'observer la présence de thrombi au sein de la valve (205). Comme précédemment décrit, le RAC se caractérise par une évolution lente correspondant en moyenne à une régression annuelle de la surface valvulaire fonctionnelle de 0,1 cm² (206).

7.1. Inflammation

À l'état physiologique, une valve aortique saine est dépourvue de cellules inflammatoires. Seuls des mastocytes, dans un état quiescent, y résident (207). L'inflammation est connue pour être le premier mécanisme physiopathologique que la valve subit durant le développement du RAC. En effet, la lésion endothéliale engendrée par les perturbations hémodynamiques génère une brèche permettant l'intrusion dans le tissu valvulaire de cholestérol et de lipoprotéines telle que la Lp(a) et la formation d'un environnement favorable pour la formation de dépôts lipidiques intra et extracellulaires (figure 17) (208).

Ces dépôts lipidiques vont contribuer à l'activation endothéliale avec l'expression d'un grand nombre de molécules d'adhésion cellulaire telles que la E-sélectine et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) (209). Ces molécules permettent le recrutement des cellules inflammatoires telles que les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T et les mastocytes (207). L'oxydation des LDL est stimulée principalement par les macrophages recrutés qui produisent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires tels que le TGF- β et le TNF α qu'ils libèrent notamment lors de la mort cellulaire (figure 17) (210).

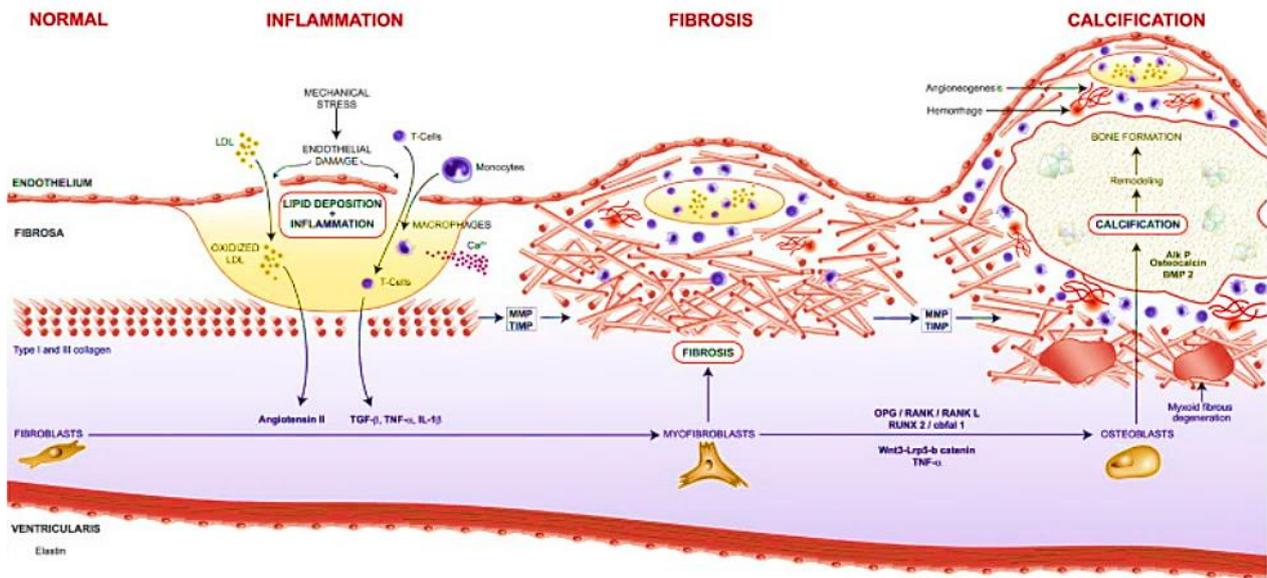


Figure 17 : Représentation schématique des principaux mécanismes physiopathologiques du RAC

D'après (190).

Les mastocytes, activés par les cytokines pro-inflammatoires, renforcent encore la réaction inflammatoire par l'activation du système rénine-angiotensine. En effet, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) entraîne la formation de l'angiotensine II par les cellules endothéliales valvulaires (VECs). Sa liaison au récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT₁), aboutit à l'accumulation des lipides au sein des macrophages et l'initiation *in fine* du stress oxydatif.

Par ailleurs, les mastocytes activés vont produire de l'histamine, de l'héparine et des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1 β et le TNF α (figure 17) (181,211).

L'inhibition d'enzymes aux propriétés antioxydantes telles que la superoxyde dismutase et la catalase et la perte de l'équilibre redox de l'état cellulaire induite par la perturbation de la balance thioredoxine (Trx) et de son inhibiteur, TXNIP (thioredoxin-interacting protein) amplifie le stress oxydatif valvulaire et l'inflammation par la production amplifiée d'IL_{1β} (212). Les cellules endothéliales acquièrent un phénotype pro-oxydant en plus de leur phénotype pro-inflammatoire par l'expression de NADPH et la libération d'espèces réactives de l'oxygène. La présence de ce stress oxydatif a pour conséquence la diminution de l'expression de la eNOS et donc une réduction du NO, qui ne peut plus exercer son action vasodilatatrice et anti-inflammatoire. Cette réduction de NO peut expliquer pourquoi les aVICs appliquent une tension importante sur les éléments de la MEC car cette molécule assure la relaxation des VICs au sein de la valve normale (213). La contraction des VICs est également favorisée par la présence de l'angiotensine II (figure 17).

7.2. Fibrose et remaniement de la MEC

Initié par la réaction inflammatoire, le remaniement de l'ECM est assuré par les aVICs. En effet, les cytokines inflammatoires produites induisent l'activation des VICs qui, d'une part, renforcent l'inflammation du tissu valvulaire et, d'autre part, assurent la réparation tissulaire (211). En effet, le changement phénotypique des qVICs en aVICs est favorisé par l'IL_{1β} et le TNF α via la phosphorylation de Smad 2/3 (Figure). Les aVICs vont alors sécréter du FGF-2 en quantité abondante ainsi que les différents éléments de l'ECM pour reconstruire l'architecture tissulaire de la valve grâce aux protéases qu'elles synthétisent : MMP-1, -2, -3, -9 et -12 ainsi que les cathepsines S, K et V, enzymes également produites par les lymphocytes T et les macrophages (figure 17) (214,215). Par ailleurs, dans un contexte de valve saine, il existe un équilibre physiologique entre le système rénine-angiotensine, système profibrotique, et le système kinine-kallikréine (système antifibrotique). En revanche, une augmentation accrue de l'ECA favorise la dégradation et l'élimination de la bradykinine, médiateur principal du système kinine-kallikréine. Il existe alors un renforcement du déséquilibre entre ces 2 systèmes en faveur du système rénine-angiotensine et ainsi de la fibrose tissulaire (211,216). De plus, les MMPs sont produites au niveau de la MEC sous forme de zymogènes, donc inactives, les pro-MMPs. Ces dernières sous leur forme active stimulent la plasmine, élément-clé de la fibrinolyse et qui est elle-même activée par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA, tissue Plasminogen Activator) et l'urokinase (u-PA, urokinase-type Plasminogen Activator) ; tous

trois présents au sein de la valve aortique sténosée (217,218). L'apparition de la fibrose valvulaire tissulaire est à l'origine d'un déséquilibre de la balance synthèse/dégradation de la MEC en faveur d'un excès de sa synthèse (219). A son tour, la fibrose valvulaire pourrait amplifier la réaction immunitaire en produisant massivement le biglycan, un protéoglycane de la spongiosa. Ce dernier possède une haute affinité pour les LDL entraînant leur rétention dans la valve et favorisant ainsi l'inflammation (220). Bien que le processus de fibrose permet de compenser la dégradation des fibres de collagène de la MEC, il n'existe pas de mécanisme compensatoire de la dégradation des fibres élastiques. Ainsi, la couche ventricularis est essentiellement constituée de fibres d'élastine fragmentées et désorganisées (221). Par conséquent, la fibrose valvulaire et la dégradation des fibres élastiques participent à la rigidification de la valve aortique.

7.3. Néo-angiogenèse

Le processus de l'inflammation est étroitement lié à la néo-angiogenèse car les aVICs et certains types de cellules inflammatoires régulent l'expression de facteurs pro-angiogéniques et de facteurs anti-angiogéniques. Pendant l'épisode inflammatoire, des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et ses récepteurs, Tie 2 et la périostine, sont surexprimés (222,223). En revanche, la chondromoduline-1, l'endostatine et la SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), des facteurs anti-angiogéniques sont réprimés (224,225). En effet, la présence du facteur de transcription FGF-2, le remodelage tissulaire valvulaire et la fibrose induisent la néo-angiogenèse par l'activation de la voie de signalisation TGF β /Smad (figure 17) (226). Les conséquences de la vascularisation du tissu valvulaire sont (1) l'amplification de la réaction inflammatoire par l'infiltration de nouvelles cellules inflammatoires comme le démontre la corrélation positive entre la présence de lymphocytes T et le nombre de néo-vaisseaux sanguins (227) et (2) l'hémorragie intravalvulaire présente chez 78 % des patients atteints de Sao sévère (228).

7.4. Calcifications

Les calcifications présentes au sein de la valve aortique sténosée sont constituées de différents sels de calcium et en particulier d'hydroxyapatite formant une structure similaire à celle de l'os (229). Les mécanismes précis impliqués dans la calcification sont néanmoins

controversés. En effet, deux hypothèses différentes pourraient expliquer la formation des calcifications : d'une part, il existe la théorie de la calcification dystrophique et, d'autre part, la théorie de la différenciation ostéogénique/ de l'ossification (169). Le principe du processus de la calcification dystrophique repose sur le fait que les calcifications valvulaires génèrent un grand nombre de cellules apoptotiques qui à leur tour participent à l'ossification de la valve aortique. Ces calcifications sont issues de la libération massive du calcium consécutive à la mort cellulaire/ nécrose des cellules valvulaires (184). Secrété par les cellules immunitaires, le TGF- β , pourrait induire l'apoptose des cellules valvulaires par le biais de la plasmine. En effet, la protéolyse résultant des interactions entre la MEC et les cellules valvulaires représente un mécanisme d'initiation de la mort cellulaire en activant la voie de la perte d'adhésion cellulaire (217,230,231). Par une coloration oil Red et un immunomarquage, Olsson *et al* ont démontré que les dépôts calciques présents au niveau de la valve aortique colocalisaient avec les zones riches en lipides (LDL oxydés) et en cellules inflammatoires telles que les lymphocytes T (232) (figure 18).

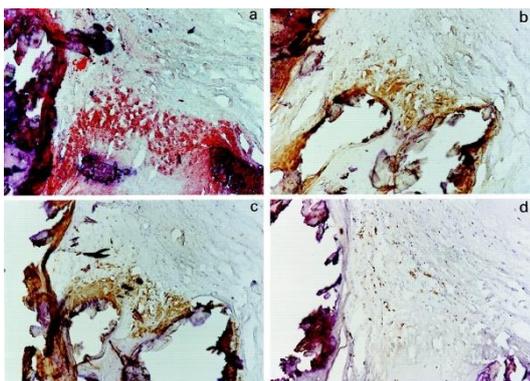


Figure 18 : *colocalisation des dépôts lipidiques (LDL oxydés) et des cellules inflammatoires*

Coloration classique permettant la mise en évidence des LDL oxydés (232).

La minéralisation du tissu valvulaire est donc consécutive à la formation des dépôts lipidiques et de la présence des cellules inflammatoires (233). Par ailleurs, il a été montré que la phospholipase A₂ associée aux lipoprotéines (Lp-PLA₂, lipoprotein-associated phospholipase A₂) est retrouvée à des niveaux d'expression élevés au niveau de la valve aortique. La Lp-PLA₂ est responsable du relargage par les LDL oxydés de lysophosphatidylcholine (LPC). Les LPC sont de puissants activateurs de l'ossification via l'activation de la voie de signalisation de l'adénosine monophosphate cyclique/protéine kinase A (AMPc/PKA) (234). Au sein d'une valve sténosée, une glycoprotéine matricielle impliquée dans la formation cartilagineuse et osseuse, la ténascine-C est retrouvée à des taux très similaires à ceux de la MMP-2. *In vitro*, il a été démontré que la ténascine est également capable de stimuler l'expression de la MMP-2.

Induite par les nombreuses cytokines inflammatoires présentes, elle serait ainsi impliquée dans le processus de calcification dystrophique car, outre le fait qu'elle stimule la prolifération, la migration et différenciation cellulaire, elle est également impliquée dans l'apoptose cellulaire (215,231).

La théorie de la différenciation ostéogénique est décrite comme un processus actif de calcification. Son principe s'appuie sur la présence d'obVICs exprimant massivement différents facteurs pro-ostéogéniques comme l'ostéonectine, l'ostéocalcine, le facteur de transcription Runx2 ainsi que la PAL et la sialoprotéine. Parallèlement, l'expression de facteurs anti-ostéogéniques tels que l'OPN et l'ostéoprotégérine par les obVICs est fortement réduite au sein de la valve sténosée (233,235). Par ailleurs, il a été démontré qu'au sein de valves sténosées, l'augmentation significative de l'expression de RANKL est concomitante à la diminution significative de cellules positives à l'ostéoprotégérine (236). RANKL stimule l'initiation de la différenciation ostéoblastique à travers la voie de signalisation médiée par l'ostéoprotégérine/ RANK-RANKL (237). La présence d'obVICs est en fait due à la différenciation cellulaire d'aVICs induite par la réaction inflammatoire.

Par ailleurs, l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires stimulent la surexpression des BMPs : BMP-2 et BMP-4 par les VECs. Ces BMPs vont induire l'activation des voies de signalisation cellulaire Runx2/ Notch1 et Wnt-Lrp5- β cat qui sont responsables de l'induction de la différenciation ostéoblastique (238). Zhang *et al* ont rapporté que la voie Runx2/ Notch1 est renforcée par la faible expression du microARN à type 30b puisque ce dernier est impliqué dans l'inhibition de l'expression de Runx2 (239). De plus, la protéine matricielle anticalcifiante Gla (MGP, matrix Gla-protein) est retrouvée à des faibles taux d'expression au sein de la valve aortique. En effet, en condition physiologique, elle inhibe la différenciation ostéoblastique des VICs par liaison et inhibition des BMP (240).

Des études récentes suggèrent que ces deux théories sont non-exclusives et ne peuvent pas être dissociées l'une de l'autre. Elles seraient donc complémentaires. Il a été montré par Cot *et al.*, qu'en réponse à l'élévation du stress mécanique présent au niveau intraventriculaire, l'*ENPP1* est surexprimée au sein de la valve aortique sténosée. Sous l'action de l'eNPP1 exprimée à la surface des VICs, l'ATP est dégradée. Cette réaction génère le PPi puis ce dernier est dégradé en Pi par les cellules obVICs. De plus, la fixation de l'ATP au récepteur P_2Y_2 engendrant un effet anti-apoptotique, la baisse d'ATP favorise la mort cellulaire. Ainsi, la dégradation de l'ATP par l'eNPP1 amplifie la minéralisation de la valve (241). Il a

également été montré que le TGF- β augmente l'expression de l'OB-CDH (cadhérine-11) par les aVICs, à travers l'activation de la voie de signalisation Erk12, et cette augmentation constitue une étape clé lors de la différenciation ostéoblastique dépendante de la voie Wnt (242). De ce fait, l'ossification active de la valve aortique promeut sa minéralisation passive et inversement.

De façon importante, la présence de calcifications épaissit et rigidifie la valve aortique (204,220). A son tour, ce phénomène stimule le processus de néo-angiogenèse au sein du tissu valvulaire. A titre d'exemple, l'ostéonectine libérée par les obVICs possède la capacité de dégrader les MMPs en peptides pro-angiogéniques (220).

7.5. Les voies moléculaires calcifiantes

Les voies moléculaires impliquées dans le processus de calcification sont : la voie de signalisation RANK (activateur du récepteur du facteur de transcription nucléaire kappa β) / RANKL (ligand RANK), OPG, Wnt (sans ailes et Int-1)/ β -caténine et Notch. La présence de certains variants génétiques dans le gène *NOTCH1* est responsable de l'apparition de la bicuspidie valvulaire aortique et de formes sévères de calcifications. De plus, des études menées *in vivo* ont permis de démontrer que Notch1 induit une baisse de l'expression de BMP-2 et de Runx2 prévenant ainsi la différenciation ostéoblastique et la calcification des VICs (199). Par ailleurs, la voie Wnt/ β -caténine régule la différenciation ostéoblastique à travers l'activation de sa voie canonique.

Avec l'augmentation des dépôts calciques au niveau des cuspidés, les forces de cisaillement augmentent provoquant davantage de lésions qui à leur tour entraînent l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. Cette activation aboutit à la différenciation ostéoblastique des VICs via l'eNPP1 et donc l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire en Pi entraînant ainsi la calcification. Il a été démontré une association entre le RAC et la présence d'un polymorphisme nucléotidique de l'*ENPP1* associée à des niveaux élevés de son expression dans les valves calcifiées (241). Dans le milieu extracellulaire, l'ATP est capable de se lier au récepteurs purinergique P₂Y₂ pour inhiber l'apoptose des VICs. La diminution de la biodisponibilité de l'ATP extracellulaire engendre la mort cellulaire des VICs mais augmente également les niveaux d'IL-6. A son tour, l'IL-6 stimule l'expression de BMP-2 participant à la calcification des VICs (243).

Une autre voie impliquée dans les calcifications cardiovasculaires et la voie de la fétuine A et de la MGP. Cette dernière est activée par carboxylation et phosphorylation de manière dépendante de la vitamine K. Ainsi, il a été démontré que la présence de faibles niveaux de vitamine K est responsable d'une carboxylation inefficace de la MGP avec pour conséquence le développement de calcifications coronariennes (47). En accord, il a été observé que les patients recevant un traitement avec des antagonistes de la vitamine K, développent des calcifications au niveau vasculaire et valvulaire aortique (244,245). De plus, l'apport alimentaire de ménaquinone (vitamine K₂) diminue la calcification vasculaire et améliore la survie (246). Actuellement, les effets de la supplémentation en vitamine K sont en cours d'évaluation dans le cadre de plusieurs essais cliniques sur des cohortes de patients présentant un RAC et des calcifications au niveau coronaire.

8. La prise en charge du RAC

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement pharmacologique permettant le ralentissement de la progression de cette pathologie. A ce jour, la seule stratégie thérapeutique disponible pour les patients atteints d'un rétrécissement aortique symptomatique est de remplacer la valve aortique pathogène par une prothèse. Ce remplacement peut être effectué par voie chirurgicale (remplacement valvulaire aortique ou RVA) ou grâce à l'implantation de la prothèse par voie percutanée (*transcatheter aortic valve implantation* ou TAVI) (203).

En raison de la similarité entre le RAC et l'athérosclérose d'un point de vue physiopathologique, deux traitements pharmacologiques de référence pour l'athérosclérose ont d'abord été testés. Il s'agit des statines qui sont des inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase, et des inhibiteurs de l'ECA. D'autres essais cliniques sont en cours actuellement.

8.1. Le remplacement valvulaire

A l'heure actuelle, la chirurgie est considérée comme le traitement de référence pour la prise en charge des sténoses aortiques sévères.

8.1.1. Le remplacement valvulaire aortique RVA

Le remplacement valvulaire aortique consiste à retirer la valve aortique calcifiée du patient et de mettre à la place une autre valve biologique ou mécanique. Le choix du remplacement est basé sur plusieurs critères : la présence des comorbidités, l'âge et la compatibilité du patient au type de valve choisi. Chez les patients moins âgés, la valve mécanique est utilisée pour remplacer la valve pathologique. En revanche, chez un patient âgé de 65 ans ou plus, une valve biologique possédant une durée de vie courte et ne nécessitant pas une prise d'anticoagulants à vie est utilisée.

8.1.2. Le traitement percutané du rétrécissement aortique « TAVI »

Il y'a plus de vingt ans, le remplacement non chirurgical d'une prothèse valvulaire par voie cutané a été développé au CHU de Rouen. Il s'agit d'une intervention moins invasive que le RVA nécessitant seulement une anesthésie locale et une légère sédation (247). Le TAVI a été d'abord principalement indiqué chez les patients à haut risque chirurgical mais en 2017, les sociétés savantes européennes et nord-américaines ont étendu son indication vers les patients présentant des risques chirurgicaux intermédiaires (248).

8.2. Les approches pharmacologiques

Bien que les statines aient montré des effets positifs dans des études précliniques, leur impact sur la progression du RAC demeure limité (246). Les IEC sont néanmoins utilisés dans le contexte de la sténose aortique. Ils pourraient même avoir des effets positifs sur la dysfonction cardiaque précoce, avant l'apparition des symptômes, ainsi qu'après les procédures de remplacement, TAVI ou RVA (248–250). Le contrôle de l'hypertension, si présent, est essentiel pour éviter toute augmentation supplémentaire de la post-charge. Cependant, la prescription de médicaments, notamment les vasodilatateurs, doit être effectuée avec précaution afin d'éviter toute chute de tension symptomatique.

8.2.1. Les statines

Bien que l'hyperlipidémie ait été suggérée comme un facteur de risque du développement du RAC, l'utilisation des statines n'a pas permis de ralentir le développement de cette pathologie chez les patients. En effet, la combinaison d'une statine, la simvastatine, et d'un agent réduisant l'absorption intestinale du cholestérol, l'ézetimibe, dans une étude randomisée a permis de mettre uniquement en évidence un bénéfice de cette stratégie dans la prévention des événements cardiovasculaires ischémiques sans aucun effet sur la progression du RAC (249). Ces résultats négatifs ont été observés alors que les études menées chez l'animal et des études rétrospectives chez l'homme soutenaient l'intérêt de cette stratégie (250). Par ailleurs, chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque qui ne sont pas éligibles pour une intervention chirurgicale ou un TAVI, il est recommandé de suivre un traitement médical conforme aux directives de l'ESC concernant l'insuffisance cardiaque (251).

8.2.2. Les inhibiteurs de l'ECA

L'ECA est présente au niveau des lésions valvulaires comme au niveau des lésions aortiques sclérotiques. De plus, sa présence est retrouvée avec celle des LDL au niveau des deux lésions et ces taux sont corrélés aux LDL à l'échelle plasmatique (252). Un traitement court par un inhibiteur de l'ECA (IEC), le ramipril, a permis la correction de la dysfonction endothéliale, la réduction du stress oxydant et de la progression du RAC chez le lapin (253). Cependant, ces résultats n'étaient pas en accord avec les travaux de Reza Ardehali *et al.* qui ont observé que ni le traitement par un IEC ni un bloqueur du récepteur de l'angiotensine II (AT1) a un effet significatif sur la progression de la maladie chez les patients (254). Les IEC sont sans danger dans le contexte du RAC, avec une surveillance attentive de la tension artérielle.

8.2.3. Essais cliniques en cours

Les éléments confirmant un lien causal entre les taux de Lp(a), principalement déterminés génétiquement, et les résultats en matière de santé cardiovasculaire varient en fonction des groupes ethniques. Les conclusions tirées d'une étude publiée dans le *Journal of*

the American College of Cardiology en juillet mettent en évidence que parmi les conséquences associées à une concentration élevée de Lp(a), le risque de survenue cumulé des événements cardiovasculaires, les décès toutes causes confondues et les décès liés au évènements cardiovasculaire, étaient deux à quatre fois plus élevés par rapport aux patients ayant des concentrations plus faibles de Lp(a) (255). Ni les taux de LDL ni le traitement par les statines n'ont influencé les associations établies. Par ailleurs, Kaiser *et al*, ont évalué la corrélation entre la Lp(a) et l'évolution du RAC, y compris sa présence initiale, son apparition et sa progression, au sein d'une cohorte issue de la population générale. Cette analyse a été menée sur une période de suivi médiane de 14 ans. Les résultats ont mis en évidence que la concentration de Lp(a) est liée à la présence initiale du RAC ainsi qu'à son apparition récente, mais ne montre aucune association significative avec sa progression. Pour les individus qui avaient un RAC dès le début de l'étude, le score initial s'est avéré être le seul facteur prédictif de l'évolution ultérieure de la maladie (256).

A l'heure actuelle, il existe des médicaments candidats prometteurs ciblant la Lp(a). On retrouve trois traitements qui visent à agir sur la Lp(a) et qui sont en phase de développement avancé, soit en phase 2 ou 3 :

- Le pelacarsen (développé par Novartis/Ionis), une approche thérapeutique basée sur un oligonucléotide antisens.
- L'olpasiran (projet d'Amgen) et le LY3819469 (développé par Eli Lilly), tous deux étant des traitements utilisant des petits ARN interférents (siRNA).

Le pelacarsen est administré par auto-injection mensuelle et est en cours d'évaluation dans l'étude de phase 3 Lp(a) HORIZON, qui va inclure plus de 8 000 participants ayant déjà connu des événements cardiovasculaires d'origine athérosclérotique. Ce médicament est composé d'un brin simple d'ADN lié à la N-acétylgalactosamine (GalNAc), qui est doté d'un récepteur présent dans le foie. C'est une approche originale en matière d'administration médicamenteuse ; les hépatocytes absorbant le sucre, GalNAc, auquel est attaché un court fragment d'ADN, correspondant à une séquence de l'ARN messager de l'Apo(a), un élément essentiel de la Lp(a). Ainsi, l'ARN messager responsable de la synthèse de la Lp(a) est dégradé (257). Lors d'un essai de phase 2, l'utilisation du pelacarsen a permis une réduction de 80 % des niveaux de Lp(a) (257).

L'olpasiran, un petit ARN interférent ciblant le foie, a entraîné des diminutions considérables et durables des taux de Lp(a) chez les patients présentant une maladie cardiovasculaire athérosclérotique établie, selon les résultats de l'étude de phase 2 Océan(a)-DOSE (258). D'autre part, le LY3819469 est actuellement en phases 2 et 3 avec des résultats qui devraient être publiés sous peu (259). Enfin, le SLN360 de Silence Therapeutics, également à base d'ARN interférent, est en cours d'évaluation (260). Dans l'étude de phase 1 APOLLO, dont les résultats ont été publiés dans le JAMA, ce médicament a permis de réduire de plus de 90 % les taux de Lp(a) pour les doses allant de 300 mg et 600 mg (261).

9. Modèles *in vivo* du RAC

9.1. Modèles de souris du RAC

Malgré l'amélioration des connaissances, les mécanismes menant au développement du RAC ne sont pas encore tous connus et il s'avère nécessaire de disposer de modèles animaux adéquats afin de mieux les élucider mais également pour tester l'intérêt de nouvelles stratégies pharmacologiques. En effet, les données obtenues grâce à aux modèles existants murins et porcins de cette maladie ont été divergentes et finalement assez peu prédictives des résultats cliniques. Contrairement à d'autres pathologies telles que l'hypertension artérielle et certaines maladies auto-immunes, il n'existe pas d'animaux développant un RAC de façon spontanée. Ainsi, des modèles de RAC porcins et murins ont été mis en place grâce à la supplémentation des animaux par un régime riche en cholestérol (262). Des approches génétiques ont également été utilisées à travers la modulation de l'expression de certains gènes présentant des mutations chez les patients atteints d'un RAC (263).

Honda et *al* ont décrit le développement d'un modèle de RAC chez la souris présentant des lésions tissulaires valvulaires induites par l'insertion d'un fil dans le ventricule gauche (264). Cette méthode a abouti à une augmentation de l'AoVmax, une hypertrophie et une dilatation du ventricule gauche qui s'accompagne d'une baisse de la fraction d'éjection. De plus, l'analyse histologique de la valve a montré un épaississement du tissu valvulaire, une infiltration des cellules de type macrophagique et la présence d'une fibrose et d'une calcification (265). Cependant, l'anatomie aortique de la souris diffère de celle de l'homme.

Elle est à titre d'exemple dépourvue d'une architecture tri couche (266). Il est donc important de confirmer toutes les données obtenues chez la souris sur des valves ou des cellules humaines.

D'autre part, l'utilisation du modèle animal de souris invalidées pour la eNOS (*eNOS*^{-/-}) a permis d'établir une association forte entre la déficience en NO et le développement de valve bicuspidie chez ces animaux. En revanche, bien que la présence de bicuspidie de la valve aortique est un facteur de prédisposition au développement du RAC, aucune des souris étudiées ne présentait une sténose aortique (267). De la même façon, El Accaoui et ses collaborateurs ont montré que bien que les souris *eNOS*^{-/-} présentent au niveau des feuillets valvulaires des dépôts lipidiques et calciques, elles ne constituent pas un vrai modèle du RAC avec notamment un gradient moyen transvalvulaire très faiblement augmenté chez ces animaux (268).

Une autre voie de signalisation largement étudiée est celle de Notch1 qui est impliquée dans la régulation de la différenciation cellulaire et le processus de formation de la valve cardiaque et dont les anomalies contribuent particulièrement au développement de la bicuspidie congénitale. Des études expérimentales ont mis en évidence que l'induction des mutations hétérozygotes de ce gène aboutit à l'augmentation de l'expression des gènes pro-ostéochondrogéniques (Runx2 et BMP-2) conduisant au développement d'une sténose aortique (199) (269). La mutation hypomorphique *egfr*^{wafa2} correspond à la substitution d'un acide aminé, la glycine, par une valine localisée près du domaine de la kinase tyrosine. Les souris homozygotes *egfr*^{wafa2} possèdent une activité tyrosine kinase réduite de près de 90% en comparaison à des souris sauvages (270). Les souris porteuses de cette mutation présentent également des anomalies cutanées, oculaires et se caractérisent aussi par la présence d'un épaississement des feuillets valvulaires. Récemment, l'utilisation de ce modèle *in vivo* a permis de démontrer le développement de calcifications valvulaires associées à une élévation du gradient moyen transvalvulaire. Cependant, ce modèle se caractérise par une insuffisance aortique significative et l'augmentation du gradient moyen semble en fait dû à la présence d'un haut débit cardiaque associé à cette insuffisance aortique (271).

9.2. Modèle de lapins du RAC

Les lapins représentent le modèle animal de grande taille le plus souvent utilisé dans les études portant sur le RAC. Les lapins présentent plusieurs avantages, étant donné qu'ils i)

possèdent une morphologie de valve à trois feuillets, *ii*) réagissent aux cholestérol alimentaire, *iii*) sont relativement moins dur à gérer en raison de leur taille moyenne ; *iiii*) qu'ils partagent certaines similitudes avec le métabolisme de lipoprotéines humaines, *iiiii*) montrent une sensibilité à une calcification accélérée induite par la vitamine D2 et *iiiii*) sont disponibles sous forme de souches transgéniques et de souches naturelles mutées (263).

9.5.1. Modèles de RAC induit par un régime alimentaire chez le lapin

Le modèle animal couramment utilisé est le lapin blanc de Nouvelle-Zélande (NZWR) où l'hypercholestérolémie est induite par l'ajout de différentes quantités de cholestérol dans l'alimentation en présence ou pas de matière grasse et de vitamine D2. Un de ces modèles, utilisant des quantités modérées à élevées de cholestérol (de 0,5 à 2%), engendre des niveaux de cholestérol total dans le sang considérablement élevé et provoque parfois une hypertriglycéridémie extrême (272). Après une semaine de suivi de ce régime, la fibrose s'installe au niveau de la couche sous endothéliale de la valve. Ce processus est accompagné d'une hyperplasie de la lame basale, caractérisée par la fragmentation des faisceaux d'élastine et de collagène, ainsi qu'une accumulation de protéoglycanes au sein de la zone fibrotique (273). Vers huit semaines, une infiltration de macrophages est observée, une présence de myofibroblastes et une élévation de la prolifération cellulaire. Cela s'accompagne d'une augmentation de l'expression génique de l'ECA et de facteurs ostéoblastiques (PAL, OPN et Runx2) (274). Lorsque la vitamine D2 est ajoutée aux régimes contenant de 0,5 à 1 % de cholestérol, après 10 à 12 semaines, la calcification et l'épaississement deviennent suffisants pour provoquer une réduction de la zone d'ouverture de la valve aortique ainsi qu'une augmentation des vitesses transvalvulaires (275,276). Par ailleurs, les régimes à faible teneur en cholestérol (contenant de 0,125 à 0,25 % de cholestérol) maintiennent des niveaux de cholestérol plus modérés. Après cinq mois, des dépôts lipidiques ainsi qu'une perturbation du collagène sont observés au sein de la zone de fibrose, accompagnés de la présence de macrophages et d'OPN dans la lésion. Entre 10 et 15 mois, on constate une augmentation des macrophages, d'OPN, de la zone de collagène, de l'épaisseur et des dépôts lipidiques. Cependant, aucune calcification n'est détectée jusqu'à 30 mois, période marquée par une augmentation des macrophages, des lymphocytes T et des dépôts de collagène, ainsi que par la présence d'un flux de régurgitation (277,278). D'autre part, un traitement à base de doses élevées de vitamine D2 seul a été employé pour induire un RAC avancé. Après 8 à 10 semaines,

des modifications fonctionnelles suggérant une sténose légère sont enregistrées, comprenant une augmentation de la vitesse maximale du flux transvalvulaire et des gradients de pression élevés, ainsi qu'une réduction de la surface de la valve aortique (275). Cependant, l'association d'un régime hypercholestérolémique avec la vitamine D12 à 12 semaines engendre une altération fonctionnelle de la valve plus significative que lors de l'utilisation de la vitamine D2 seule (279).

9.5.2. Modèles génétiques de RAC chez le lapin

Différents modèles de lapins ont été développés, utilisant à la fois des mutations spontanées et des manipulations transgéniques. Ces modèles présentent principalement des altérations au niveau du récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) et/ou des apolipoprotéines qui entraînent une hypercholestérolémie en l'absence de cholestérol et dans le cadre d'un régime restreint en graisses. Quelques-uns de ces modèles incluent (238,245,280,281) :

- Les lapins hyperlipidémiques héréditaires Watanabe (WHHL), qui portent une mutation spontanée du récepteur aux LDL.
- Les lapins de l'hôpital St. Thomas, chez lesquels se développent à la fois une hypertriglycéridémie et une hypercholestérolémie.
- Des lapins présentant des profils lipidiques modifiés, tels que ceux exprimant l'apolipoprotéine B100 humaine ou l'apolipoprotéine(a).

Parmi ces modèles, seul le modèle de lapin WHHL a été utilisé dans une étude sur le RAC démontrant que la calcification induite par l'hypercholestérolémie pourrait être partiellement médiée par la voie LPR5/ β -caténine. Des revues complètes sur les modèles génétiquement modifiés de l'athérosclérose chez le lapin ont été réalisées par Brousseau et Hoeg (282) ainsi que par Fan et Watanabe (283).

9.6. Modèle porcins

Les modèles porcins sont largement reconnus comme des choix privilégiés dans la recherche sur l'athérosclérose (284), et plus récemment, ils ont également été utilisés pour l'investigation du RAC (285). Les porcs présentent de nombreuses similitudes avec les êtres

humains, notamment des caractéristiques hémodynamiques systémiques et une anatomie cardiaque comparables y compris une structure de valve aortique à trois feuillets (284). Naturellement, les porcs développent des lésions athéroscléreuses qui, sous l'effet de régimes riches en cholestérol et en graisses, évoluent vers des altérations semblables à l'homme (286–288). De plus, la taille des porcs les rend particulièrement adaptés pour les études visant à caractériser les propriétés mécaniques des valves, ainsi que pour des analyses sanguines répétées nécessaires à la recherche.

9.6.1. Modèles porcins de RAC induit par l'alimentation

Bien que les modèles porcins aient principalement trouvé leur utilité dans des études s'intéressant à l'athérosclérose, ils ont aussi été utilisés dans la recherche sur le RAC. Les régimes typiques utilisés pour induire l'hypercholestérolémie chez les porcs consistent en une alimentation standard composée de maïs et de soja, supplémentée de 1,5 à 2% de cholestérol et de 10 à 20% de matières grasses, avec parfois avec l'ajout de 0,7 à 1,5 % de cholate de sodium. Certaines indications laissent entendre que l'amorçage de ces régimes avant la maturité sexuelle pourrait se révéler plus efficace pour générer une pathologie avancée (286).

Les premières études réalisées indiquent que les porcs soumis à un régime hypercholestérolémique développent une pathologie similaire à celle observée chez les humains. Des zones localisées de densification macroscopique sont observables après six mois de régime hypercholestérolémique, en l'absence ou en présence d'un diabète. De petits nodules calcifiés sont également repérés histologiquement à l'âge de 6-7 mois, qu'il s'agisse d'un régime de deux semaines ou de six mois associé ou non à un diabète. L'infiltration lipidique sous-endothéliale se manifeste uniquement dans la couche fibreuse, et son intensité augmente avec la durée du régime. Toutefois, aucune inflammation n'est présente après deux semaines ou six mois de régime. Les variations dans les schémas d'expression génique ont suggéré que les VECs de la face aortique de la valve, semblent permissives à la formation de dépôts calciques, mais elles bénéficient d'une protection contre l'inflammation et la formation de lésions dans une valve normale grâce à des mécanismes antioxydants. Après exposition à un régime hypercholestérolémique, les VECs aortiques adoptent un profil protecteur, d

écrit comme étant anti-inflammatoire, anti-apoptotique et prévenant la calcification (289,290). Pour comprendre les mécanismes sous-jacents aux phénotypes spécifiques des

VECs du côté ventriculaire vs. le côté aortique, des investigations supplémentaires s'avèrent nécessaires.

9.6.2. Modèles génétiques porcins de RAC

Des mutations génétiques spontanées ont également été utilisées chez le porc pour créer des modèles d'hypercholestérolémie non induite par l'alimentation, en vue d'études sur l'athérosclérose ; ces modèles peuvent également convenir pour l'étude du RAC. Dans ces modèles, des mutations sont présentes dans les gènes du récepteur aux LDL et/ou les apolipoprotéines. Parmi les modèles fréquemment utilisés, on peut citer :

- Les porcs porteurs de mutations héréditaires affectant les lipoprotéines de très basse densité, présentant une hypercholestérolémie grâce aux allèles mutants *Lpb*⁵, *Lpr*¹ et *Lpu*¹ pour *ApoB* et *ApoU*, avec un récepteur aux LDL non modifié (291,292).
- Les porcs manifestant une hypercholestérolémie familiale attribuable à une mutation du gène du récepteur aux LDL, qui s'accompagne de modifications importantes des profils lipidiques (293,294).
- Les porcs présentant une hypercholestérolémie familiale due à des mutations touchant les gènes *ApoB* et du récepteurs aux LDL (295).

Ces modèles ont montré tout leur intérêt de par le développement de lésions athéroscléreuses complexes à l'âge de deux à trois ans, sans nécessiter d'intervention alimentaire (291).

9.7. Autres modèles animaux

Divers modèles animaux ont été historiquement employés pour étudier l'athérosclérose. Parmi eux figurent les rats, les hamsters, les pigeons, les cobayes, les chats, les chiens ainsi que les primates non humains, qui ont fait l'objet d'études par Moghadasian et *al* (296). Parfois, ces animaux (les chiens et les rats) ont été utilisés pour des études portant sur le RAC (297,298), et certains d'entre eux peuvent être appropriés pour examiner certaines comorbidités directement liées au RAC (150,298).

10. L'atteinte cardiaque au cours du RAC

10.1. L'hypertrophie ventriculaire gauche au cours du RAC

Il est nécessaire de considérer le RAC comme une maladie à la fois de la valve aortique et du ventricule gauche. Ce dernier va en effet s'hypertrophier et sa fonction s'altérer menant à l'insuffisance cardiaque (190).

L'hypertrophie ventriculaire gauche est par définition une masse ventriculaire gauche anormalement élevée. Elle est issue de l'élévation de la post-charge et du stress pariétal ventriculaire. Afin de préserver la fonction du ventricule gauche et de diminuer le stress pariétal, les myocytes vont augmenter de taille et l'épaisseur de la paroi augmente (299,300). Néanmoins, certaines études montrent que cette hypertrophie n'est pas uniquement adaptative. Framingham *et al* ont établi la présence d'un lien entre l'hypertrophie évolutive et la progression vers une insuffisance cardiaque (301). Ainsi, la présence d'une hypertrophie ventriculaire gauche témoigne d'un pronostic défavorable chez le patient (302,303). Par ailleurs, il existe des différences de la réponse hypertrophique du ventricule gauche chez les patients atteints d'un RAC. Ces variations sont d'une très grande importance pronostique et peuvent être à l'origine de l'hétérogénéité observée entre l'apparition des symptômes et la gravité du RAC. En effet, dans leur étude Cioffi *et al* ont démontré que parmi 218 patients atteints d'une maladie grave asymptomatique, un taux de mortalité accru est retrouvé chez les patients présentant une masse ventriculaire gauche élevée par rapport aux sujets ayant un RAC similaire mais une hypertrophie moins prononcée. Le mécanisme de ce pronostic défavorable est potentiellement associé à une décompensation ventriculaire gauche prématurée (304). Cependant, chez certains patients, une évaluation par échocardiographie a montré que le degré d'hypertrophie ventriculaire gauche n'est pas toujours lié à la gravité du rétrécissement aortique (305). Ceci a été plus tard confirmé par une étude utilisant l'imagerie par résonance magnétique cardiaque (306). Ainsi, le degré d'hypertrophie ventriculaire en présence d'un RAC semble être modulé par d'autres facteurs comme l'âge, le sexe (masculin) et l'obésité (305,307). D'autres facteurs notamment génétiques peuvent également affecter le degré de la réponse hypertrophique au cours du RAC et notamment les polymorphismes du gène de l'ECA (308).

Par ailleurs, le degré d'hypertrophie est également régulé par des facteurs participant à l'augmentation de la post-charge observée chez les patients atteints d'un RAC. En

effet, l'analyse de l'essai SEAS (Simvastation and Ezetimibe in aortic stenosis) a montré que chez des patients atteints de RAC asymptomatique, l'hypertension artérielle concomitante impacte significativement la géométrie du ventricule gauche et est associée avec une masse du ventricule gauche et une épaisseur relative de la paroi plus élevées (309). De plus, la rigidité artérielle accrue participe à l'élévation de la post-charge et prend part à la baisse de la fonction ventriculaire gauche dans le RAC. Cette baisse de la compliance artérielle systémique est souvent retrouvée en raison de la combinaison d'un âge avancé avec d'autres comorbidités (diabète et hypertension artérielle) (310). Sur la base de ces éléments, Hachicha et ses collaborateurs ont proposé un nouvel indice de charge hémodynamique globale du ventricule gauche à savoir l'impédance Z_{va} . Ce dernier est calculé à partir du gradient moyen transvalvulaire et de la compliance artérielle systémique. Il représente en fait le coût en mm Hg pour chaque millilitre de sang pompé par le ventricule gauche pendant la systole, indexé en fonction de la taille du corps. D'autres équipes ont établi que cet indice était plus performant que les indices standards de gravité du RAC pour prédire une dysfonction du ventricule gauche. Les résultats ont démontré que l'augmentation du marqueur Z_{va} permettait d'identifier les patients avec un mauvais pronostic atteints d'un RAC modéré et sévère. Enfin, cette étude souligne l'utilité du Z_{va} comme un outil d'amélioration du risque et de la prise de décision clinique (311).

10.2. La progression de l'hypertrophie vers l'insuffisance cardiaque

Au départ bénéfique, l'hypertrophie ventriculaire gauche entraîne une augmentation progressive et délétère du travail cardiaque qui va aboutir au développement de l'insuffisance cardiaque. Celle-ci est à l'origine de l'apparition d'évènements et de symptômes cliniques de mauvais pronostic chez les patients atteints d'un RAC. Hein *et al* dans une étude comparant trois groupes de patients ayant subi un RVA avec des fractions d'éjection différentes (FE > 50 %, FE 30% à 50% et FE < 30%) et un groupe de témoins (sans RAC et avec une fonction ventriculaire gauche normale), ont établi que la transition de l'hypertrophie vers l'insuffisance cardiaque se produit parallèlement au développement de la fibrose et de l'apoptose des myocytes. Cependant, lorsque la post-charge excessive revient à la normale après un RVA, le processus auto-entretenu de dégénérescence des myocytes, de mort cellulaire et de fibrose de remplacement sera maintenu. Ce cycle chronique va renforcer significativement

le dysfonctionnement systolique du ventricule gauche et favoriser le mauvais pronostic des patients (312).

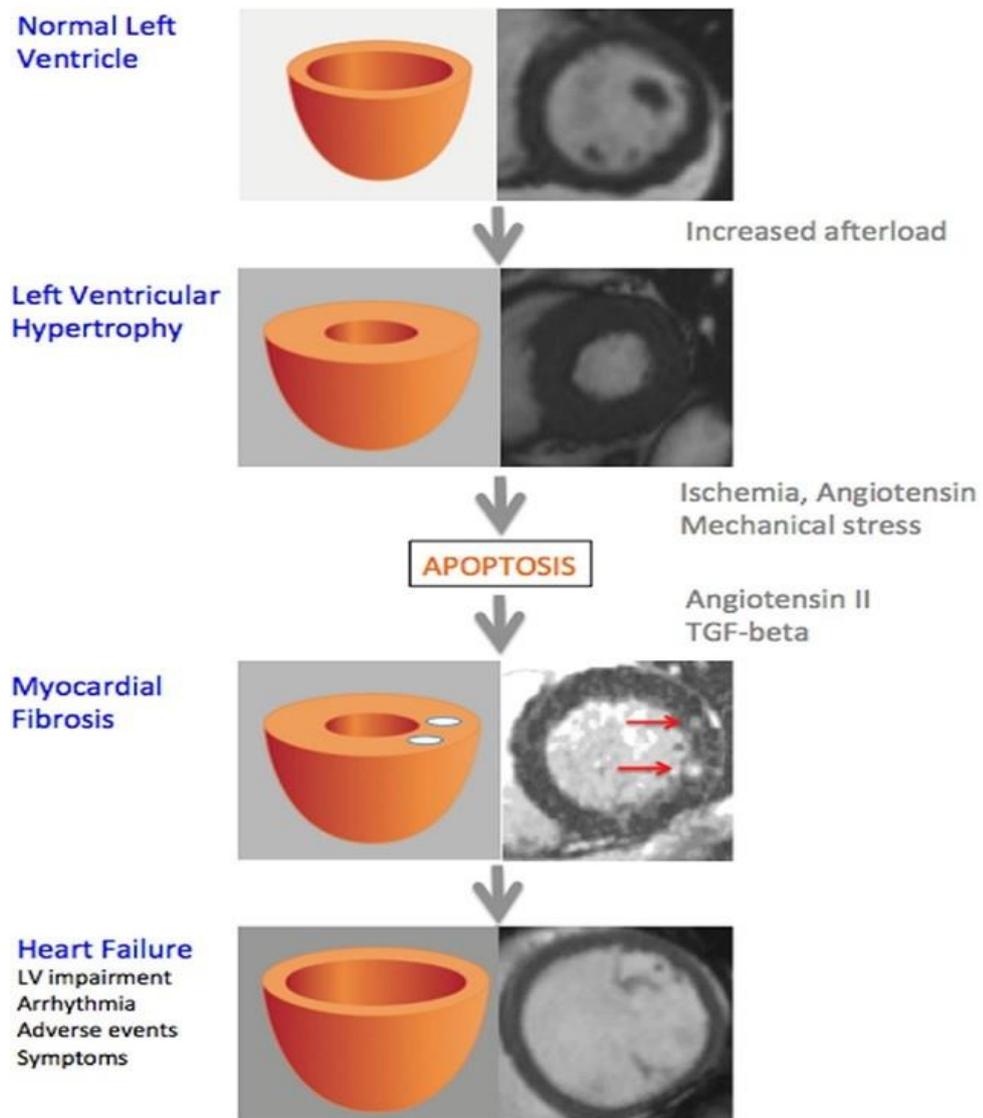


Figure 19 : Le développement et la décompensation ultérieure de l'hypertrophie du VG en réponse à la sténose aortique

D'après (313).

10.3. L'apoptose des myocytes

Le pourcentage d'apoptose des myocytes dans le muscle cardiaque hypertrophié a été évalué entre 5 % à 10 % chaque année (314). Ce phénomène d'apoptose des myocytes est normalement compensé par leur régénération mais celle-ci est insuffisante en cas d'hypertrophie, entraînant une baisse du nombre de ces cellules. L'élévation des taux d'apoptose pourrait être une réponse à l'élévation des contraintes mécaniques ainsi que des concentrations locales d'angiotensine (163-165).

L'ischémie, c'est-à-dire la réduction de l'apport en oxygène, peut également jouer un rôle important. Au cours du RAC, la demande en oxygène du myocarde s'accroît en raison de l'élévation de la masse musculaire cardiaque et de la post-charge. A la différence de l'hypertrophie physiologique, les vaisseaux capillaires du réseau coronaire ne se développent pas suffisamment afin de répondre à cette demande accrue, ce qui altère la perfusion coronaire cardiaque (figure 19) (317). Des recherches menées par Galiuto *et al* ont mis en évidence chez les patients atteints d'un RAC sévère et ayant des artères coronaires normales, une détérioration de la perfusion myocardique. Cette réduction de la perfusion sanguine était liée à une augmentation de l'apoptose des myocytes (318).

10.4. La fibrose

Des études histopathologiques ont confirmé que la fibrose accompagnait le développement de l'hypertrophie du myocarde (319). En effet, les myofibroblastes pénètrent le tissu myocardique et libèrent des protéines de la MEC, notamment du collagène de type I et III (320). De façon intéressante, il a été observé que les zones de fibrose co-localisent avec les régions où les myocytes sont en apoptose (321), supportant l'hypothèse que la fibrose se produit en réponse à une forme de cicatrisation après l'apoptose des myocytes. De manière similaire à la fibrose valvulaire, ce processus implique le système rénine-angiotensine, le TGF β , ainsi qu'un déséquilibre entre les métalloprotéinases de la matrice et leurs inhibiteurs tissulaires (figure 19) (322,323).

L'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique cardiaque avec le gadolinium en rehaussement tardif permet de visualiser de manière non invasive la fibrose de remplacement au sein du muscle cardiaque. Il est ainsi observé que plus d'un tiers des patients présentant un

RAC modéré à sévère, présente une fibrose touchant la paroi médiane du myocarde associée à une hypertrophie cardiaque avancée. Il s'avère que la présence de fibrose dans la paroi médiane multiplie également le risque de décès par huit (324). Ainsi, cette méthode peut servir de marqueur pronostique et constituer un moyen de repérer une altération de la réponse hypertrophique avant que l'insuffisance cardiaque ne se manifeste (figure 19). Toutefois, les mécanismes sous-tendant ce pronostic restent en partie mal connus. Cela témoigne probablement en partie de la présence d'une dysfonction systolique et diastolique liée à l'apoptose et à la fibrose du myocarde, la première provoquant une baisse de la capacité de contraction du ventricule et la seconde entraînant une augmentation de la rigidité ventriculaire (312,325). Cependant, l'arythmie peut également y contribuer (326). On a observé une association entre le rehaussement tardif du gadolinium et l'arythmie ventriculaire dans d'autres pathologies cardiaques (327). La fibrose prédispose à l'arythmie en perturbant la conduction électrique, en induisant la formation de circuits de réentrée et en modifiant la période réfractaire et l'excitabilité des cellules musculaires cardiaques (328). Il est important de noter que, même après un remplacement de la valve aortique, les patients souffrants d'un RAC restent exposés à un risque important de mort subite, souvent lié à une hypertrophie marquée du ventricule gauche (329). Bien que cette hypothèse soit prometteuse, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour clarifier la contribution de l'arythmie maligne à la mort subite d'origine cardiaque dans le contexte du RAC.

*Chapitre III – L'activité phosphatase de l'époxyde
hydrolase soluble et les calcifications
cardiovasculaires*

1. Les époxydes hydrolases

L'oxydation des lipides notamment des acides gras insaturés entraîne fréquemment la formation de composés contenant des époxydes. Ces composés jouent un rôle essentiel dans divers processus biologiques chez plusieurs types d'organismes. Par des voies enzymatiques ou par des processus d'auto-oxydation les lipides oxydés peuvent être produits (330–333). De nombreuses enzymes telles que les époxydes hydrolases (EHs) possèdent la capacité de transformer les époxydes en composés ayant une réactivité chimique réduite, une solubilité dans l'eau élevée, et une activité biologique modifiée (334).

Enzymes	Localisation sou-cellulaire	Substrats
EH soluble chez les mammifères	Cytosol, peroxysomes	Acides gras époxydés, phospholipides
EH soluble dans les plantes	Cytosol, glyoxysomes	Acides gras hydroxylés, acides gras époxydés
EH hépoxiline	Cytosol, membranes plaquettaires	Acides gras hydroxylés, acides gras époxydés
LTA4_ hydrolase	Cytosol	5(6)-époxyeicosa-poly-énoïques
EH microsomale	Membrane plasmatique du réticulum endoplasmique	Stéroïdes époxydés
EH cholestérol	Réticulum endoplasmique	Epoxydes de cholestérol
Hormone juvénile	Réticulum endoplasmique	Hormones juvéniles, acide gras époxydés

Tableau 1 : Localisation et substrats lipidiques des époxydes hydrolases

D'après (335).

Les EHs sont largement répandues dans le règne animal. Chez les vertébrés, cinq types d'EHs ont été identifiés : l'EH soluble (sEH), l'EH microsomale (mEH), l'EH de cholestérol (ChEH), l'hépoxiline hydrolase et la leucotriène A4 (LTA4) hydrolase. On trouve également des équivalents de l'EH soluble chez les plantes, où ils jouent un rôle dans le métabolisme des lipides époxydés. L'hormone juvénile EH (JHEH) est quant à elle une enzyme

responsable du métabolisme des acides gras époxydés chez les insectes, présentant une similitude avec les mEH. Le tableau 1 résume la localisation subcellulaire et les substrats endogènes connus de ces EHs (336–338).

2. L'époxyde hydrolase microsomale (mEH)

La mEH est codée par le gène *EPHX1*. A l'inverse de la sEH, la mEH ne possède pas un large domaine N-terminal. Cependant, la particularité de cette enzyme est qu'elle possède un domaine transmembranaire fortement hydrophobe constitué d'une vingtaine d'acides aminés (10,11). La suppression de ce domaine n'aboutit pas à la perte de l'activité enzymatique de la mEH. Elle conduit en revanche à une perte de solubilité (340). Chez le rat, la purification des fractions de la mEH par chromatographie suggère que ceux-ci présentent une association avec certains phospholipides suggérant *in fine* l'existence d'un complexe d'accrochage de la mEH à la membrane cellulaire (341).

3. L'époxyde hydrolase soluble

Codée par le gène *EPHX2*, la sEH est une enzyme localisée principalement au niveau cytosolique. Elle est cependant retrouvée également au niveau des peroxysomes chez certains mammifères 5). Cela dépend potentiellement de la structure quaternaire de la sEH et de son taux d'expression protéique 6). Par ailleurs, Mullen *et al* (345) avaient suggéré dans leurs travaux que cette différence de localisation résulterait d'une différence de ciblage cytosolique et peroxysomal chez le rat et la souris. Son expression est ubiquitaire mais elle est principalement retrouvée au niveau du cœur, du foie, des poumons, des reins et des ovaires 17). Il s'agit d'une enzyme bifonctionnelle et homodimérique. Ces dimères, de poids moléculaire de 62,5 kDa chacun, sont liés par un pont riche en proline (14,15). Au niveau de chaque dimère on retrouve deux domaines catalytiques distincts (figure 20). Une activité hydrolase (sEH-H) est localisée à son extrémité C-terminale tandis que sa partie N-terminale est dotée d'une activité phosphatase (sEH-P) (335). De nombreuses études réalisées chez des rongeurs ont révélé que l'expression de la sEH est contrôlée par la famille des proliférateurs de peroxysomes (PPs), à travers l'activation de leurs récepteurs, les récepteurs nucléaires PPARs (18,19,20).

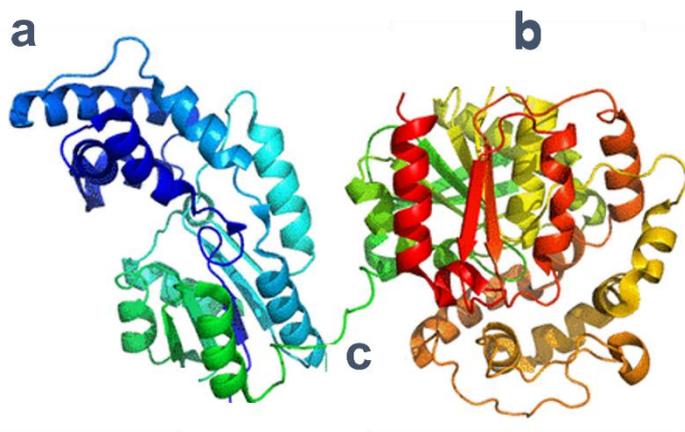


Figure 20 : Structure cristalline d'un homodimère de la sEH humaine

a : domaine N-terminal (l'activité phosphatase), b : domaine C-terminal (l'activité hydrolase), c : domaine riche en proline permettant la liaison entre les deux monomères (350).

4. Régulation de l'activité de la sEH

Malgré son expression constitutive, il est important de noter que l'activité de l'époxyde hydrolase soluble chez les vertébrés peut être induite afin de pouvoir s'adapter aux variations de l'environnement. Par exemple, il a été démontré que la consommation de cigarettes entraîne une réduction temporaire de l'activité de la sEH, et que cette diminution est corrélée avec la quantité de cigarettes fumées (351). Plusieurs études ont montré que l'activité de la sEH chez les mammifères est soumise à une régulation hormonale. On a observé, chez la souris et le rat, que l'activité de la sEH est plus élevée chez les mâles que chez les femelles (352,353). Chez la souris, cette différence d'activité entre les sexes était plus marquée dans le rein des mâles (283%) que dans leur foie (55%), par rapport aux femelles. La castration a réduit l'activité de la sEH dans les deux organes, et les niveaux d'activité ont été restaurés par une supplémentation en testostérone (352). Une étude chez des rats mâles a confirmé que la transcription du gène de la sEH était induite par les androgènes (354). De la même façon, l'administration de testostérone aux rats femelles a provoqué une augmentation plus marquée de l'activité de la sEH dans les reins que dans le foie. A l'inverse, chez les souris femelles, la suppression des ovaires a entraîné une augmentation de 30% de l'activité de la sEH dans le foie et les reins (352). Par ailleurs, l'administration d'estradiol a réduit l'activité de la sEH dans le foie d'animaux mâles mais pas chez les femelles (355). Une autre découverte intéressante est que l'hypophysectomie entraîne une augmentation de l'activité hépatique de la sEH chez la souris femelle, tout en réduisant cette activité chez la souris mâle, suggérant que ces effets sont

dus à la perte d'hormones gonadotropes (356). Par ailleurs, les processus de développement jouent également un rôle dans la régulation des niveaux de la sEH. Bien que l'importance précise de la sEH dans le développement soit encore peu comprise, l'absence de modification de la viabilité des souris invalidées pour la sEH (357) suggère que l'absence de ce gène n'est pas crucial pour le développement fœtal. La démonstration de l'existence d'une activité de la sEH documentée dans le développement des vertébrés a été enregistrée chez le poisson téléostéen, le médaka doré (*Oryzias latipes*), environ 2 jours après la fécondation, ce qui correspond à la formation tardive de la blastula, avant une différenciation cellulaire significative (358). Chez l'homme, une activité associée à la sEH (mesurée dans des tissus hépatiques et extrahépatiques de fœtus et de sujets adultes) a été détectée dès la 14^e semaine de gestation, apparaissant dans plusieurs tissus, sans modification notable d'activité (359).

5. L'activité sEH hydrolase (sEH-H)

L'activité hydrolase réside dans l'extrémité C-terminale dont le poids moléculaire est d'environ 35 kDa. Cette région présente une structure repliée ressemblant à celle d'une protéine de la famille des α/β -hydrolases, partageant des similitudes avec l'haloalcane déshalogénase bactérienne, ainsi qu'avec les EHs solubles des plantes et celles présentes dans les microsomes (360). Elle permet d'hydrolyser les acides gras époxydés en leurs diols correspondants. Parmi les substrats préférentiels de la sEH on retrouve le 14,15-EET, le 11,12-EET, le 8,9-EET et le 5,6-EET. Ces EETs sont rapidement métabolisés dans le cytosol par l'activité sEH-H en composés biologiquement moins actifs : les DHETs (361).

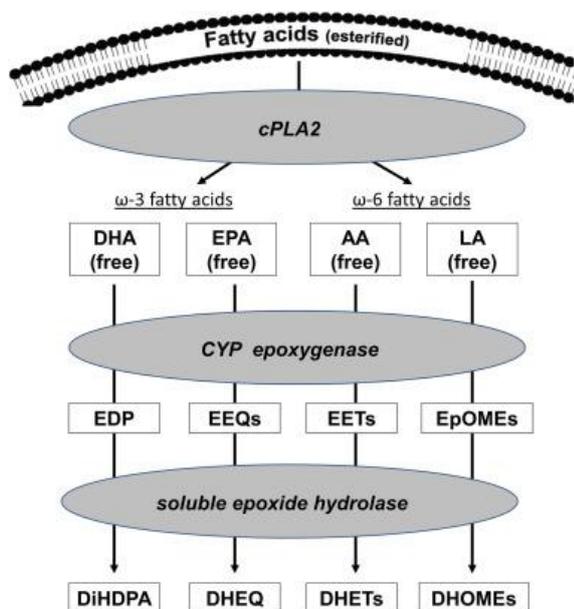


Figure 21 : les acides gras époxydés métabolisés par l'activité sEH

D'après (362).

5.1. Les substrats de la sEH-H

L'activité sEH-H hydrolyse de nombreux substrats endogènes qui sont les acides gras époxydés (figure 21). La sEH-H métabolise donc les EETs mais également les acides époxydocosapentaénoïques (EDPs), les acides époxyeicosatétraénoïques (EEQs), les acides époxyoctadécamonoénoïques (EpOMEs) et les hépoxilines (32).

5.1.1. Les acides époxyoctadécamonoénoïques (EpOMEs)

Les EpOMEs sont issus du métabolisme de l'acide linoléique, un acide gras polyinsaturé oméga-6 de 18 atomes de carbones, sous l'action des cytochrome P450 de type époxygénase. Les acides dihydroxyoctadécaénoïques (DiHOMEs) sont le produit de l'hydrolyse des EpOMEs par la sEH-H.

Dans un contexte pathologique, des données de la littérature démontrent l'implication des DiHOMEs dans la physiopathologie du diabète et on note d'ailleurs une élévation de leurs concentrations chez les patients diabétiques (364). De plus, ces diols seraient potentiellement des biomarqueurs utiles pour la surveillance des patients asthmatiques avec une élévation de leurs taux plasmatiques après exposition à un allergène (365). Moghaddam *et al*

ont montré *in vivo* que le 9,10-EpOME, très présent à l'état physiologique, est une protoxine et que son diol correspondant est cytotoxique et associé à certaines maladies respiratoires dont le syndrome de détresse respiratoire aigu (366).

5.1.2. Les acides époxyeicosatétraénoïques (EEQs)

A partir de l'acide eicosapentaénoïque (EPA), un acide gras polyinsaturé omega-3, les EEQs également appelés EpETE sont générés par la voie des cytochrome P450. La sEH-H métabolise ces acides gras époxydés en diols appelés acides dihydroxyeicotétraénoïques (DHEQ). Il existe différents régioisomères des EEQs dont le plus répandu est le 17,18 EEQ. Ce dernier possède des effets bénéfiques *in vivo* et notamment il prévient l'infiltration leucocytaire qui témoigne d'une action anti-inflammatoire puissante (367).

Au niveau cardiaque et pulmonaire, ce régioisomère exerce également des effets protecteurs chez l'homme. Il est vasorelaxant par son action sur les cellules musculaire lisses pulmonaires d'une part et contrôle la contraction des cardiomyocytes d'autre part (38,39). Contrairement au 9,10-EpOME, le 17,18 EEQ est doté d'un pouvoir anti-allergique lorsqu'il est administré *in vivo* (370).

5.1.3. Les acides époxydocosapentaénoïques (EDPs)

Les cytochromes P450 de type époxygénase peuvent également métabolisés un autre type d'acide gras polyinsaturé oméga-3 constitué de 22 atomes de carbone, l'acide docosahexaénoïque (DHA). Les acides gras époxydés générés sont les acides époxydocosapentaénoïques EDP ou EpDPA. Ces derniers sont en outre métabolisés par la sEH-H en diols, les acides dihydroxydocosapentaénoïques DiHDPA. Les EDPs ont des effets physiologiques variables mais leur mécanisme d'action demeure cependant mal connu du fait de la variété de localisation cellulaire de ces acides gras (371). Le 19,20-EpEDPA est le régioisomère le plus fréquemment retrouvé des EpDPA. Il possède un large éventail d'effets physiologiques importants et est impliqué à différents stades du processus de la tumorigenèse (372).

Par ailleurs, il a été montré que l'utilisation d'un inhibiteur de la sEH-H et le traitement par le 19,20 EpEDPA dans un modèle d'hypertension dépendante de l'angiotensine II chez le petit animal a abouti à une diminution nette de la pression artérielle de ces animaux (373). De plus, dans un modèle de cytotoxicité cardiaque induite par le LPS, il a été montré que le 19,20 EpDPA protège la fonction des cellules HL-1 et favorise la biogenèse mitochondriale au moyen de l'activation du gène *SIRT1* (374).

5.1.4. Les acides époxyeicosatriénoïques (EETs)

Ce sont des médiateurs lipidiques qui résultent du métabolisme de l'acide arachidonique qui exercent non seulement des effets autocrines mais également paracrines. L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé oméga-6 à 20 atomes de carbone. Il est impliqué dans plusieurs-mécanismes oxydatifs. Sous l'action d'une classe d'enzyme, les phospholipases A₂, les phospholipides membranaires libèrent l'acide arachidonique. Le métabolisme de ce dernier aboutit à la formation de trois classes d'eicosanoïdes. On note trois voies métaboliques principales de l'acide arachidonique : la voie des cyclooxygénases (COX) qui forment les prostaglandines, la voie des lipooxygénases (LOX) permettant la formation des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) et des leucotriènes et la voie des cytochromes P450 qui génèrent des EETs par époxydation mais également par hydroxylation des HETEs (46). Les diols issus de l'hydrolyse des EETs par la sEH-H sont les acides dihydroxyeicosatriénoïques (DHETs) qui sont considérés biologiquement moins actifs mais possèdent également des effets qui leur sont propres. En particulier, les EETs, et dans une moindre mesure les DHETs, sont capables d'induire des effets au niveau vasculaire, rénal mais également cardiaque (377) (378). L'action cardiovasculaire la mieux décrite des EETs est leur propriété vasodilatatrice. Cette vasodilatation a été observée dans de nombreux organes en réponse à l'ajout des EETs (dans le cœur, le rein, l'intestin, le muscle squelettique et le cerveau) (50,36,31). Cependant, à l'échelle pulmonaire, les EETs induisent une vasoconstriction et sont largement impliqués dans la vasoconstriction pulmonaire normoxique et hypoxique. Ces effets inattendus des EETs n'étaient pas retrouvés lors de l'inactivation génétique du gène codant pour le canal cationique potentiel de récepteur transitoire sous-famille C, membre 6 (TRPC6) chez la souris démontrant l'implication de ce récepteur (31). De plus, les effets pulmonaires des EETs, en cas d'exposition à l'hypoxie chez la souris, sont abolis suite à l'inhibition sélective

de l'époxygénase CYP2C29 soulignant ainsi le rôle clé de cette voie en particulier dans le remodelage pulmonaire en réponse à l'hypoxie (383). En effet, les mécanismes sous-jacents de la vasodilatation dépendante des EETs, et notamment le 11,12-EET et le 14,15-EET, reposent sur l'activation des canaux K^+ activés par le calcium ($K_{Ca^{2+}}$) de la cellule musculaire lisse favorisant une hyperpolarisation de sa membrane cellulaire en réponse à la sortie de potassium (384). Par ailleurs, certaines données de la littérature ont montré la présence d'autres mécanismes à l'origine de l'activation des canaux K^+ par les EETs à travers l'activation de l'AMPc, de la protéine kinase A et de la ribosylation de l'ADP (56,57). L'utilisation des inhibiteurs de la sEH-H inhibe l'hydrolyse des EETs et ainsi augmente leur biodisponibilité et l'effet vasodilatateur (387).

Les EETs et la sEH-H sont par ailleurs des régulateurs de la prolifération et de la migration des cellules musculaire lisses et endothéliales qui sont des éléments clé de la régulation de l'homéostasie vasculaire. Dans leurs travaux, Guijun *et al* ont attribué au 11,12-EET un rôle pro-angiogénique en favorisant la prolifération des cellules endothéliales humaines à travers l'activation de la sphingosine kinase 1 (388). D'autres études ont montré que les EETs permettent également la régulation de la pression artérielle selon deux mécanismes différents : un premier qui dépend de l'action des EETs sur le tonus vasculaire des petites artères de résistance et un second en promouvant la natriurèse rénale (61).

5.2. Les inhibiteurs de l'activité sEH-H

L'utilisation des modèles animaux invalidés génétiquement pour la sEH et la mise en évidence de l'association de polymorphismes génétiques du gène *EPHX2* modifiant l'activité de la sEH-H chez l'homme et certaines maladies cardiovasculaires ont montré que l'augmentation de la biodisponibilité des EETs par l'inhibition de la sEH est protectrice contre le développement de ces maladies. Par conséquent, l'inhibition de l'activité sEH-H constitue une cible thérapeutique prometteuse pour la prise en charge des maladies liées au développement de la fibrose et de la dysfonction vasculaire. Le développement de molécules pharmacologiques inhibitrices de l'activité sEH-H visant à augmenter la biodisponibilité des EETs a débuté au début des années 2000 et des études menées sur leurs propriétés pharmacocinétiques après optimisation ont permis d'obtenir une délivrance par voie orale de ces inhibiteurs (391). Ces agents sont dirigés spécifiquement contre l'activité sEH-H sans impact sur l'activité phosphatase de la sEH (63,64).

Deux molécules structurellement similaires : les oxydes chalcones et le trans-3-phénylglycides étaient les premiers inhibiteurs de la sEH-H (394). Quelques temps après, d'autres molécules plus puissantes et stables ont été développées à savoir les dérivés de l'urée (395). Enfin, de nombreuses études menées chez l'animal ont mis en évidence que l'inhibition pharmacologique de la sEH-H prévient la survenue des complications cardiovasculaires liées au diabète de type 2 (figure 22) (396).

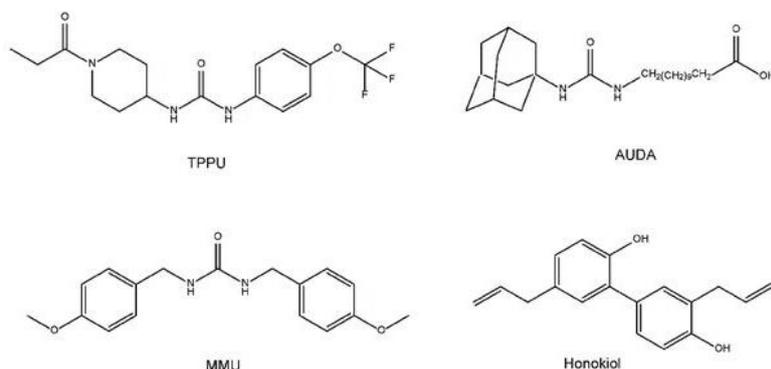


Figure 22 : Structure chimique des inhibiteurs de la sEH

D'après (2).

5.3. Impact de l'inhibition de l'activité sEH-H au cours de la calcification vasculaire

Les travaux de Varennes et *al* ont démontré que l'activité de la sEH-H exerce un rôle protecteur contre le développement de la calcification vasculaire en métabolisant les EETs (398). Afin de mieux comprendre le rôle de l'activité sEH-H dans le processus de calcification vasculaire, des anneaux aortiques de rats ont été soumis à des conditions de culture riches en phosphate, en présence et en absence de l'inhibiteur spécifique, l'acide trans -4-(4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy)-benzoïque (t-AUCB) et d'EETs exogènes. L'avantage clé de l'utilisation de t-AUCB par rapport à l'inactivation génétique du gène de la sEH est qu'il inhibe spécifiquement l'activité sEH-H, sans affecter sa deuxième activité enzymatique, la sEH-P (395,399). Dans un premier temps, l'évaluation des dépôts de calcium et les analyses histologiques ont confirmé que pour induire une calcification significative de l'aorte, il était nécessaire de maintenir une concentration de 3,8 mM de phosphate pendant une période de culture de 7 jours (400). L'ajout de t-AUCB à une concentration de 10 μ M a augmenté la calcification des anneaux aortiques de rats lorsque ceux-ci étaient exposés à une concentration élevée de phosphate, suggérant que l'activité sEH-H jouerait un rôle protecteur lors de la calcification vasculaire. À cette concentration de 10 μ M, le t-AUCB a également provoqué une

augmentation significative de l'expression de l'ARNm des marqueurs ostéochondrogéniques Runx2, Msx2 et Sox9 ainsi que de l'activité de la TNAP. Par ailleurs, les niveaux de PPi n'ont pas diminué dans le milieu de culture des anneaux aortiques traités avec le t-AUCB, mais cela pourrait être attribué à la présence préexistante de PPi dans ce milieu en conditions basales. De plus, il a été constaté que le t-AUCB n'a pas eu d'effet procalcifiant sur les anneaux aortiques qui avaient été désendothélialisés ni sur les CMLVs humaines, tandis que l'ajout du 11,12-EET ou du 14,15-EET au milieu de culture a rétabli l'effet procalcifiant du t-AUCB. Ces effets procalcifiants des EETs exogènes sur les CMLVs n'ont été observés qu'en présence de t-AUCB, tandis que dans le cas des aortes, les EETs exogènes seuls étaient suffisants pour favoriser la calcification vasculaire. Cette constatation suggère que la potentialisation de la calcification vasculaire par les EETs exogènes peut se produire soit en l'absence soit en présence de leurs métabolites DHETs. Cela confirme que la sEH exerce un rôle protecteur contre la calcification vasculaire en métabolisant les EET endogènes produits par les cellules endothéliales. De plus, ces travaux ont souligné que l'inhibition de la PKA a supprimé l'augmentation de l'activité de la TNAP et la potentialisation de la calcification induite par les EETs, confirmant ainsi l'implication de cette voie de signalisation, comme précédemment indiqué pour la régulation par les EET de la prolifération des CMLVs (401).

6. L'activité sEH phosphatase (sEH-P)

A sa découverte, la sEH a été décrite comme une enzyme d'expression ubiquitaire ayant une activité hydrolase localisée au niveau de son domaine C-terminale. Des années plus tard, il a été mis en évidence que la sEH est une enzyme bifonctionnelle et que son extrémité N-terminale possède une autre activité catalytique, de type phosphatase (402) (399). En effet, le domaine N-terminal de la sEH d'une masse d'environ 25 kDa présente une homologie structurale avec des résidus enzymatiques des haloacides déshalogénases. De plus, il semble que ce domaine joue un rôle crucial dans le maintien de la structure globale du dimère par un effet stabilisateur. La comparaison de ces domaines a montré que l'extrémité N-terminale est un site catalytique de la sEH possédant l'ensemble des constituants nécessaires à l'activité phosphatase. Les phosphatases sont des enzymes catalytiques qui en utilisant, différents mécanismes, effectuent une hydrolyse des groupements monoesters de phosphate. Différents substrats peuvent être hydrolysés par les phosphatases tels que les acides nucléiques, les protéines phosphorylées et d'autres métabolites (71,72). De Vivo *et al* et Cronin *et al* avaient

suggéré dans leurs travaux un mécanisme d'action de la sEH-P dépendant de la présence des cations de magnésium Mg^{2+} qui agissent comme cofacteurs (73,74). Ces derniers vont produire un dérivé d'alcool et une molécule d'hydrogénophosphate (407). Après libération d'alcool du site actif de l'enzyme, le site actif est régénéré et l'hydrolyse du groupement phosphate est effectuée.

6.1. Les substrats de la sEH-P

Depuis la découverte de l'activité sEH-P, de nombreux substrats endogènes candidats ont été proposés. Rapporté par Oguro et *al*, l'exposition à l'hypoxie provoquait une baisse nette de l'expression de la sEH à la fois dans le foie de souris et dans une lignée cellulaire d'hépatome humain, Hep3B. Bien que l'hypoxie entraîne la prolifération des cellules endothéliales vasculaires et des cellules cancéreuses, l'inactivation du gène de la sEH dans les cellules Hep3B a induit une augmentation des taux d'ARNm du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et de la croissance cellulaire. En revanche, ces effets ont été supprimés par la surexpression de la sEH. La mutation inactivatrice du domaine hydrolase et phosphatase, par le changement d'acide aminé Asp335Ser ou Asp9Ala respectivement, a favorisé la perte des effets de la sEH sur la croissance cellulaire. Cependant, uniquement la mutation du domaine hydrolase impacte l'expression du VEGF (408). Ainsi, il a été suggéré que des médiateurs lipidiques seraient des substrats endogènes de la sEH-P. Ils réguleraient *in fine* la croissance et la prolifération cellulaire (409). De plus, l'étude *in vitro* des effets d'une variété de phospholipides sur l'activité phosphatase de la sEH a permis de mettre en évidence les substrats endogènes de cette enzyme. Il s'agit d'une triade de substrats à savoir les acides lysophosphatidiques (LPAs), qui sont les substrats préférentiels, les isoprénoides pyrophosphates et la sphingosine-1-phosphate (SP1) (410) (figure 23).

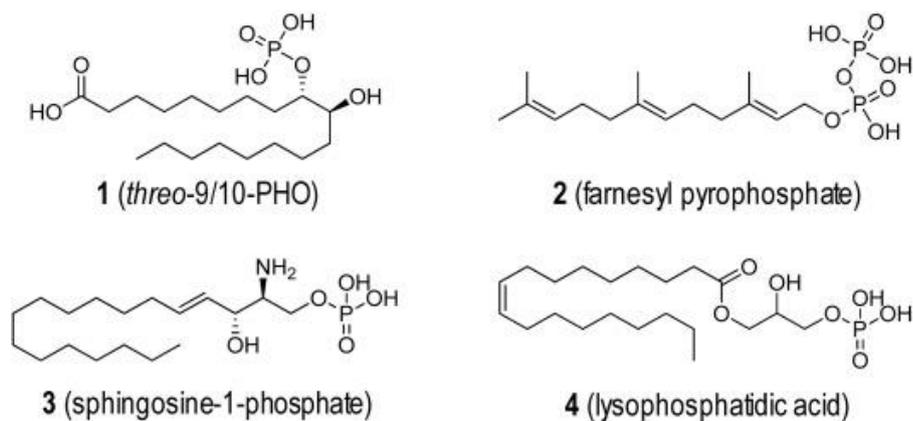


Figure 23 : Substrats endogènes de la sEH-P

D'après (411).

6.1.1. Sphingosine-1-phosphate (SP1)

La SP1 est issue de la phosphorylation d'une sphingosine, composé commun à tous les sphingolipides, par deux types de kinase la sphingosine kinase 1 et 2 (SPHK1 et SPHK2) (412). La SP1 est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques qui sont assurées par la fixation de la SP1 sur ses récepteurs transmembranaires couplés à une protéine G (413). Elle joue un rôle important dans le processus tumoral et la réponse immunitaire par le contrôle de la croissance et la survie cellulaire (414). De plus, la liaison de la SP1 produite par les plaquettes à son récepteur stimule l'angiogenèse en agissant comme un facteur chimio attractant des cellules endothéliales après un épisode de coagulation (415). La SP1 est déphosphorylée en sphingosine par l'action phosphatase de l'activité sEH-P.

6.1.2. Les isoprénoïdes pyrophosphates

Les terpénoïdes ou les isoprénoïdes sont des molécules à cinq atomes de carbones qui forment la base de divers composés organiques. Ils sont également impliqués dans la biosynthèse du cholestérol (416). De manière intéressante, Tran *et al* avaient montré *in vitro* que les dérivés isoprénoïdes pyrophosphates comme le géranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP), le géranyl-pyrophosphate (GPP) et le farnésyl-pyrophosphate (FPP) sont des substrats endogènes de la sEH-P. Ces derniers sont dotés de propriétés anti-inflammatoires et sont largement impliqués dans la voie de synthèse des stérols (417). Les isoprénoïdes pyrophosphate sont convertis en leur alcools correspondants avec une libération de deux molécules de

phosphate sous l'action de l'activité sEH-P. En effet, cette réaction se produit en deux étapes séquentielles, la deuxième étape étant nettement plus rapide que la première (417).

6.1.3. Les acides lysophosphatidiques (LPAs)

Des études *in vitro* ont démontré que les acides lysophosphatidiques (LPAs) palmitoyle, stéaroyle, oléoye et archidonoye inhibent l'activité de la sEH-P et sont des substrats de la sEH-P (410). Les LPAs sont très présents dans les fluides biologiques comme la lymphe et le sang et ils peuvent être libérés par différents types cellulaires tels que les adipocytes, les cellules cancéreuses, les plaquettes et les fibroblastes (418). Longtemps considérés comme acteurs clés de la synthèse des glycérolipides, les LPAs sont également des phospholipides bioactifs régulant plusieurs processus cellulaires (419).

Deux voies principales sont impliquées dans la biosynthèse des LPAs :

- Le clivage des lysophospholipides (LPL) par action de l'autotaxine, une lysophospholipase, comme les lysophosphatidylcholine (LPC) et les lysophosphatidylsérine (LPS) (420).
- L'hydrolyse des acides phosphatidiques par des phospholipases A₁ et A₂ (PLA₁ et PLA₂) (421).

Les récepteurs de ces médiateurs lipidiques sont divers et appartiennent à la famille des récepteurs membranaires couplés à une protéine G (G_q, G_s, G_i et G_{12/13}). La diversité des LPAs et de leurs récepteurs est à l'origine d'une variété des voies de signalisation impliquées dans différents processus chez l'homme. On note leur participation à régulation de la contractilité cardiaque, de la survie des cardiomyocytes et de l'hypertrophie cardiaque (422). Les LPAs contrôlent également la perméabilité vasculaire et l'inhibition de cette voie est une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux (423). L'activité sEH-P catalyse la réaction de déphosphorylation des LPAs en monoacylglycérol.

D'autre part, les LPAs sont des agonistes de PPAR γ (424) suggérant que la sEH-P régulerait cette voie de signalisation en diminuant leur concentration intracellulaire.

6.2. Les inhibiteurs de la sEH-P

Plusieurs études expérimentales ont visé à identifier des inhibiteurs dirigés contre la sEH-P (figure 24). L'utilisation *in vitro* des dérivés sulfates, phosphates et sulfonates lipidiques a abouti à l'inhibition de l'activité N-terminale phosphatase de la sEH mais aussi à l'altération de l'activité sEH-H (417). En 2012, l'ebesen a été identifié comme un inhibiteur pharmacologique de la sEH-P. Brièvement, un test de criblage à haut débit utilisant un substrat fluorescent de l'activité sEH-P, le phosphate de 2'-[2-benzothiazoyl]-6'-hydroxybenzothiazole (AttoPhos), a été employé pour mesurer l'activité enzymatique. A partir notamment de l'analyse d'une bibliothèque de médicaments, les résultats ont montré que l'ebesen présente une affinité pour le domaine N-terminal et que cette interaction de nature chimique entraîne une inhibition rapide et irréversible de l'activité sEH-P. Cependant, en plus de ses effets antioxydants connus, l'ebesen inhibe également l'activité de sEH-H avec une constante d'inhibition (K_i) de 500 nM (425). Enayetallah *et al* avaient identifié un autre inhibiteur, un dérivé du groupement géranyl, farnésyl et géranylgéranyl, à savoir le N-Acetyl-S-L-cysteine (AFC) (426). L'AFC est un substrat synthétique des méthyltransférases isoprénylées. Il a été utilisé pour montrer l'existence d'une interaction entre la sEH-P et la NO-synthase endothéliale (eNOS) (426). Des recherches menées avec le composé SMTP-7, du nom des phénols triprényl de *Stachybotrys microspora* (avec une IC_{50} de 24 μ M sur la sEH-P) ont révélé un effet anti-inflammatoire et antioxydant de ce composé après thrombolyse. Ces effets ont été médiés par l'inhibition simultanée par le SMTP-7 à la fois de la sEH-H et la sEH-P. Il est important de noter que ce composé n'interagit pas directement avec le site catalytique de l'enzyme, mais plutôt via un site allostérique (427). En 2016, un criblage à haut débit *in vitro* a identifié l'oxaprozine, un inhibiteur des cycloxygénases, comme inhibiteur du domaine N-terminal de la sEH n'ayant pas d'effet sur la sEH-H (428).

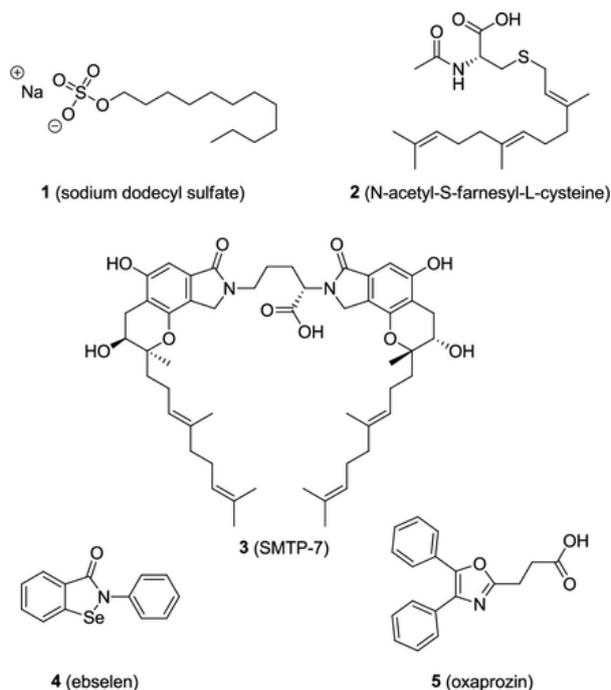


Figure 24 : les inhibiteurs de l'activité phosphatase de la sEH

D'après (350).

Par la suite, des optimisations ont été réalisées à partir de l'oxaprozine permettant la mise au point d'un nouvel inhibiteur, l'acide 4-(4-3(3,4-dichlorophznyle -5-phényloxazole-2-yl) butanoïque (22b SWE101), ayant une spécificité plus intéressante sur la sEH-P humaine et de rat même s'il persiste un effet inhibiteur des cycloxygénases et de la sEH-H à fortes concentrations (350). Cet inhibiteur a été utilisé avec succès *in vivo* avec une augmentation des LPAs circulants et hépatiques après administration aigue chez le rat (350). Cependant, les fortes doses nécessaires limitant sa spécificité et l'absence d'effet chez la souris limitent son utilisation pour étudier l'intérêt de l'inhibition de la sEH-P *in vivo*.

7. Rôle physiologique de la sEH-P

En raison de l'absence d'inhibiteurs spécifiques et efficaces du domaine N-terminale de la sEH-P *in vivo*, peu de données sont disponibles concernant le rôle physiologique de la sEH-P. Le rôle physiologique du domaine sEH phosphatase reste partiellement compris, mais nous allons résumer ici les principales théories qui ont émergé. L'une des premières idées suggérait que la principale fonction du domaine phosphatase était d'améliorer la stabilité de la structure protéique et la stabilité globale de la protéine (429). De plus, il a été proposé un lien entre la fusion/dimérisation des gènes et certaines fonctions de régulation. Ces théories ont

trouvé un certain appui avec des preuves expérimentales suggérant une interaction coopérative entre les deux domaines et une réduction de la stabilité et de l'activité du monomère sEH. D'autres études expérimentales ont cependant suggéré que la sEH-P pourrait également contribuer à la régulation de certaines fonctions biologiques, notamment participer au contrôle de la voie de synthèse des stérols et de l'activation de la eNOS. L'oxyde nitrique (NO) est un gaz dérivé de l'endothélium qui joue un rôle primordial dans la régulation du tonus vasculaire (430). Un défaut de la régulation de la eNOS, enzyme produisant le NO à partir de la L-arginine, est associé au développement de différentes pathologies en particulier de l'hypertension artérielle (431). Un ensemble de voies de signalisation impliquant des protéines phosphatases et kinases contrôle l'activité enzymatique de la eNOS. La voie des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) en est une. En effet, il a été démontré que l'utilisation du VEGF comme traitement *in vitro* a abouti à l'augmentation de l'activité de la eNOS au niveau des cellules endothéliales via l'augmentation de sa phosphorylation sur le résidu serine (s187) par la phosphoinositide 3-kinase/Akt (432). De plus, Il a été montré dans un modèle de souris délétées pour le gène de la sEH que le traitement avec des EETs exogènes entraîne une vasodilatation eNOS-dépendante, suggérant un rôle important de l'activité sEH-H dans le processus de régulation de la eNOS (433). En revanche, le VEGF peut également contrôler négativement l'activité de la eNOS et diminuer ainsi la biodisponibilité du NO. En effet, la eNOS au niveau des cellules endothéliales est phosphorylée par la protéine kinase C (PKC), suite à l'activation du VEGF (434). De plus, Hsin-Han-Hou et ses collaborateurs ont montré qu'il existe un dialogue entre la sEH et la eNOS en réponse au VEGF. Bien que l'inhibition de l'activité sEH-P augmente l'activité de la eNOS, l'inhibition de l'activité la sEH-H n'a pas abouti à ce même effet. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents du contrôle de la eNOS par la sEH-P, stimulé par le VEGF, demeurent mal connus (435).

Une autre étude a confirmé le rôle régulateur négatif de l'activité de la sEH-P dans le contrôle de la voie d'activation de la eNOS sous l'effet d'un hypocholestérolémiant, la simvastatine. Au-delà de son utilisation pour le traitement de l'hyperlipidémie et des complications cardiovasculaires associées, en inhibant la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (103,104), la simvastatine stimule la production du NO en agissant sur la eNOS au niveau des cellules endothéliales (105,106). En effet, lorsque les cellules endothéliales sont exposées à la simvastatine, cela entraîne une augmentation de l'activité de la sEH-P, qui, à son tour, exerce un effet négatif sur la phosphorylation des protéines Akt, AMPK et de la eNOS induite par la simvastatine. Cette régulation négative contribue au maintien de la

production de NO. De plus, l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques et des modifications génétiques de l'activité sEH-P ont montré que l'augmentation de l'activité sEH-P induite par la simvastatine dépend de l'activation de la signalisation du récepteur du facteur de croissance endothéliale « EGFR – c-Src ». En parallèle de l'activation de l'eNOS, le traitement des cellules endothéliales avec la simvastatine entraîne rapidement la phosphorylation de la tyrosine de la sEH et renforce considérablement l'interaction physique entre la sEH, Akt, AMPK et la eNOS (figure 25) (426).

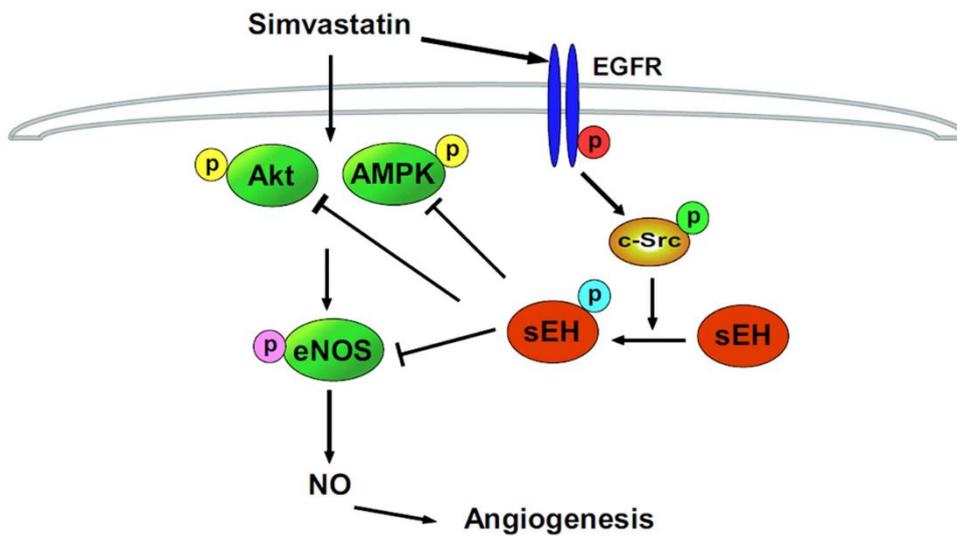


Figure 25 : Mécanisme illustrant le rôle de l'activité sEH-P dans la régulation de l'activation de l'eNOS induite par la simvastatine et la production du NO dans la cellule endothéliale

D'après (426).

En outre, de nombreuses études ont montré que la sEH-P exerce un rôle important dans le contrôle du métabolisme, notamment du cholestérol, et la croissance cellulaire (76,107). Dans un modèle d'athérosclérose induite chez la souris par traitement avec des LDL oxydés, l'activité de la sEH-P prévient l'accumulation du cholestérol au niveau des macrophages. Ces effets ont été médiés partiellement par l'augmentation de l'expression des transporteurs ATP-A1 binding cassettes (ABCA1) et de l'efflux de cholestérol (441). Ces résultats ont confirmé le

rôle crucial de la sEH-P dans le métabolisme du cholestérol en inhibant la formation des macrophages spumeux retardant ainsi la progression de l'athérosclérose (109,110).

Par ailleurs, il a été récemment démontré que la sEH-P joue un rôle essentiel dans le maintien des concentrations de phospholipides impliqués dans la régulation de la signalisation autocrine de la réponse inflammatoire au sein des macrophages péritonéaux (444). L'utilisation d'un inhibiteur de la sEH-P, l'acide amino-hydroxybenzoïque (AHBA), a interrompu la déphosphorylation des LPAs entraînant une atténuation considérable des fonctions liées à l'inflammation.

8. Les polymorphismes du gène *EPHX2* et le lien avec les maladies cardiovasculaires

L'analyse de la structure primaire de la sEH suggère que son gène est le produit de la fusion de deux gènes codants pour deux enzymes de type déhalogénase. Bien que le domaine N-terminal soit similaire à la déhalogénase haloacide, l'extrémité C-terminale présente une homologie avec la déhalogénase haloalkane (111,30). Ce gène est localisé au niveau du chromosome 8. Il contient 18 introns et 19 exons de taille de 45 kb et dont 15 kb ont été séquencés (446). Des études précédentes avaient mis en évidence la présence de deux isoformes de ce gène appelée *EPHX2B* et *EPHX2C*. En effet, il s'agit d'une substitution d'acides aminés localisés au niveau des deux premiers exons (113,114). Le clonage de l'ADN complémentaire de la sEH humaine au niveau hépatique a démontré que sa structure monomère est composée de 544 acides aminés (449).

Les polymorphismes mononucléotidiques (SNPs) représentent la forme la plus courante de variation génétique présente dans le génome humain. Les SNPs permettent d'établir des liens entre des variations de séquence génétique entraînant des modifications d'activité enzymatique et des modifications phénotypiques, en particulier les caractéristiques clinico-biologiques des patients. En effet, il existe des SNPs pour les gènes *EPHX1* et *EPHX2* codants respectivement pour la mEH et la sEH. La présence de deux mutations faux sens du gène *EPHX1* a été documentée. L'une de ces mutations est localisée au niveau de l'exon 3 du gène : rs1051740T > C (Tyr113His) et entraîne une diminution de 39% l'activité enzymatique de la mEH (450). L'exon suivant (4) porte le second SNP rs2234922A>G (His139Arg) qui augmente l'activité de la mEH (450). Des méta-analyses avaient démontré que la présence de ces SNPs étaient un facteur de risque important au développement de certains types de cancers

(poumon et prostate) (117,118). De même, plus de 100 SNPs et des mutations faux sens touchant le gène codant pour la sEH ont été rapportés chez l'homme (453). Des travaux ont pu suggérer que des mutations affectent l'activité enzymatique de la sEH. El Kadi et collaborateurs avaient rapporté que les polymorphismes génétiques induisant une baisse de l'activité de cette enzyme sont systématiquement liés à un haut risque de maladies cardiovasculaires (454). En comparaison avec l'allèle le plus fréquent (l'allèle sauvage, NG012064), on note des SNPs qui altèrent de façon significative la fonction hydrolase de la sEH par la baisse de son expression et de sa stabilité : le variant rs751141 A > G (Arg287Gln) et le double mutant rs17057255 A > C et rs751141 A > G (Arg103Cys / Arg287Gln) (455).

Parmi les SNPs qui impactent l'activité phosphatase de la sEH, on retrouve :

- Les mutations rs41507953 (Lys55Arg) et rs57699806 qui se traduisent par une baisse de l'activité de la sEH-P (453).
- Les variants rs751141 (Arg287Gln) et le rs17057255 qui ont été associés à une élévation de l'activité de la sEH-P (456). De façon plus précise, le R287Q semble diminuer l'activité de la sEH-P pour les LPAs et l'augmenter pour ses autres substrats.

En particulier, parmi ces SNPs deux ont été largement documenté :

- Rs41507953 (Lys55Arg) : L'étude ARIC (The Atherosclerosis Risk in Communities) a mis en évidence que ce mutant qui à la fois diminue de 15% l'activité de la sEH-P et augmente celle de la sEH-H (106) est associé à une élévation du risque d'incidence des coronaropathies. Cette association a été démontrée au sein de la population caucasienne, mais n'a pas été retrouvée dans la population afro-américaine. De plus, il a été montré que des SNPs du CYP2J et du CYP2C, qui sont des cytochromes impliqués dans la production des EETs à partir de l'acide arachidonique, participent à la physiopathologie des maladies cardiovasculaires (457) et de l'hypertension artérielle (458,459).
- Rs751141 (Arg287Gln) : à l'inverse du variant Lys55Arg, il augmente la réponse vasodilatatrice médiée par l'endothélium chez les individus blancs américains (460).
- L'étude Coronary Artery Risk Development in Young Adults "CARDIA" a mis en évidence une association entre la présence du SNP R287Q et le développement de calcifications artérielles coronariennes dans une population afro-américaine, mais cette association n'a pas été retrouvée dans une population caucasienne (461). Une analyse en sous-groupes de l'étude CARDIA a également révélé que le tabagisme, qui augmente l'expression du gène *EPHX2*, est lié à une augmentation du risque de calcification

artérielle coronarienne (462). De manière intéressante, des SNPs situés dans des régions non codantes du gène *EPHX2*, comme les régions 5' et 3' UTR, ont été identifiés comme associés au développement des calcifications des plaques des artères carotides et coronaires chez des patients d'origine africaine et caucasienne dans l'étude "Diabétique Heart Study" (463). Ces résultats montrent également que le polymorphisme R287Q est associé à une augmentation de la calcification des plaques carotidiennes dans les populations euro-américaines. De plus, la présence de certains autres polymorphismes du gène *EPHX2* est associée à la calcification coronarienne et carotidienne, ainsi qu'à une augmentation de l'épaisseur intima-média de l'artère carotide. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la modulation des activités de la sEH-P contribue à la régulation du développement des calcifications vasculaires.

Objectifs de la thèse

L'époxyde hydrolase soluble est une enzyme bifonctionnelle qui possède une activité phosphatase et une activité hydrolase. Alors que de nombreux travaux ont été réalisés sur l'activité hydrolase et menés jusqu'au développement clinique d'inhibiteurs pharmacologiques, très peu de données sont disponibles sur le rôle physiologique et physiopathologique de l'activité phosphatase. Ainsi en l'absence d'agents pharmacologiques utilisables *in vivo* pour moduler cette activité phosphatase, nous avons utilisé un modèle murin transgénique au moyen de la méthodologie CRISPR/Cas9 afin de l'inactiver spécifiquement et obtenir des rats Knock In pour l'activité phosphatase de la sEH (KI-sEH-P). Au cours de ma thèse nous nous sommes intéressés au rôle de l'inhibition de l'activité phosphatase de la sEH dans les calcifications cardiovasculaires.

Les calcifications cardiovasculaires ou encore dites calcifications ectopiques représentent un pathophénotype terminal très répandu. Leur développement est associé au vieillissement, au diabète, à l'hypertension artérielle, l'athérosclérose et l'insuffisance rénale chronique. L'apparition et la progression de ces calcifications augmentent la morbidité cardiovasculaire chez les patients. Les calcifications cardiovasculaires sont aujourd'hui connues comme étant un processus actif qui mène à la formation de dépôts de cristaux d'hydroxyapatite, et qui présente des similarités avec le mécanisme de minéralisation osseuse. Ces calcifications peuvent se développer au niveau vasculaire notamment au niveau de la média, mettant en jeu les CMLVs qui vont se différencier en cellules de phénotype ostéoblastique, ainsi qu'au niveau de la valve aortique menant au RAC. Aucun traitement pharmacologique n'est aujourd'hui disponible pour prévenir ou ralentir le développement des calcifications cardiovasculaires.

L'hypothèse formulée dans ce travail est que l'activité phosphatase de la sEH est impliquée dans la régulation du processus des calcifications cardiovasculaires. En particulier, l'inhibition de l'activité enzymatique de la sEH-P pourrait prévenir le développement et la progression des calcifications cardiovasculaires.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse ont été d'évaluer l'impact de l'inhibition de la sEH-P sur les calcifications artérielles et valvulaires aortiques au moyen d'approches *in vitro* sur des cellules humaines et *ex vivo* sur des aortes et des valves de rats. De plus, des études *in vivo* ont été réalisées au moyen du modèle murin transgénique KI-sEH-P permettant de déterminer l'impact de l'inhibition de l'activité phosphatase de la sEH sur :

1/ Le développement des calcifications artérielles et des complications cardiovasculaires dans un modèle d'insuffisance rénale chronique chez le rat.

2/ Le développement des calcifications valvulaires aortiques et du RAC dans un modèle d'insuffisance rénale chronique chez le rat soumis à un régime riche en phosphate.

Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire

Après exérèse au bloc opératoire, la valve aortique a été imprégnée dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) et transportée sur glace jusqu'au laboratoire. Afin de séparer les hVICs des hVEC, le feuillet valvulaire aortique a été coupé en plusieurs petits morceaux et ensuite incubé 3 heures à 37°C sous agitation douce avec de la collagénase de type I (à 0,3%, Thermoscientific). A l'aide d'un tamis cellulaire de 40µm (Falcon), le surnageant a été filtré avant d'être centrifugé 5 minutes à 1500g. Avec du milieu de classique DMEM (dulbecco's modified eagle medium, Gibco) supplémenté d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine 1%, Sigma-Aldrich) et de SVF 5% (Gibco), le culot cellulaire, contenant les hVICs, a été resuspendu. Les hVICs ont été ensuiteensemencées dans une flasque de culture préalablement coatée avec du collagène à type I (100 µg/mL, Gibco) à une densité de 3×10^5 cellules/cm. Dans les mêmes conditions de culture cellulaire que les hVECs, les hVICs ont été cultivées et n'ont pas été utilisées au-delà du cinquième passage.

2. Modèles animaux expérimentaux

2.1. Expérimentation animale

Les expérimentations animales ont été réalisées en accord avec les directives de l'Institut National de la Santé. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique régional de l'Université de Rouen Normandie, conformément à la législation française et européenne (APAFIS#9108- 2017030215075973). L'ensemble des animaux a été maintenu dans des conditions standards avec un cycle jour/nuit de 12 heures à une température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture.

2.2. Génération des rats knock-in pour l'activité sEH-P

Afin d'étudier spécifiquement la fonction de sEH-P, une édition génétique *in vivo* du gène *ephx2* a été entreprise. Il s'agit d'une mutation ciblée d'*ephx2* en remplaçant le résidu catalytique, du domaine de l'activité sEH-P d'acide aspartique 9 par l'alanine (D9A). Cette mutation est bien connue pour inhiber complètement l'activité de sEH-P *in vitro*. Par la technologie du génome editing basée sur la méthode de CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) des rats Sprague-Dawley knock-in (KI) ont été générés.

Pour cela, un ARN guide unique (sgRNA-rEphx2-2.3), de l'ARNm Cas9, et un brin simple d'ADN donneur (ssODN) ont été employés. Le ssODN a été conçu pour introduire la mutation D9A, créer un site de restriction XbaI afin de faciliter le génotypage par PCR, et éliminer la séquence cible du sgRNA pour éviter la coupure après l'intégration. Après confirmation du KI, les fondateurs porteurs de la mutation D9A ont été croisés avec des rats de WT puis des croisements entre des rats hétérozygotes mâles et femelles ont permis d'obtenir des rats homozygotes sEH-P KI ainsi que des rats sauvages (wild-type : WT) au sein des laboratoires Janvier (Le Genest-Saunt-Isle, France) pour la réalisation des expériences ultérieures.

2.3. Génotypage des animaux

Des biopsies de queues pour le génotypage ont été réalisées chez des rats âgés de 8 à 10 jours, après anesthésie. Les prélèvements ont été soumis à une digestion pendant toute une nuit à 56°C en utilisant 500 µL d'une solution de digestion tissulaire (contenant Tris-HCl à 0,1 mol/L à un pH de 8,3, EDTA à 5 mmol/L, SDS à 0,2%, NaCl à 0,2 mol/L, et PK à 100 mg/mL). Les régions du génome ciblées par la nucléase CRISPR ont ensuite été amplifiées par PCR à partir d'échantillons issus de la lyse des tissus dilués (à un rapport de 1/20), en utilisant une polymérase (Herculase II fusion polymérase). Afin de détecter les modifications génétiques, des amorces spécifiques au locus *Ephx2* ont été employées, et les mutations ont été analysées à travers l'électrophorèse capillaire ainsi que le séquençage direct des produits de PCR.

Les amorces utilisées sont :

Amorce sens : GGCAGGGTTTCTAGTTCTTGG

Amorce anti-sen : TCTTGTAAGTACTGAGGCGGGTA

2.4. Modèle d'insuffisance rénale chronique : néphrectomie des 5/6ème

Ce modèle d'IRC est induit par une néphrectomie des 5/6^{ème}. Brièvement, la néphrectomie partielle des 5/6^{ème} (5/6Nx) a été réalisée en deux étapes chez des rats WT et sEH-P KI âgés de 18 semaines. Dans un premier temps et après anesthésie de l'animal, une ligature des deux branches artérielles (postérieure et antérieure) du pôle supérieur du rein gauche est effectuée. La deuxième étape de la chirurgie, réalisée 7 jours après la première, consistait en

l'ablation du rein droit. Pour les groupes d'animaux témoins, des procédures chirurgicales similaires ont été effectuées, mais sans ligature du pôle supérieur ni néphrectomie droite. Une analgésie pré et post opératoire a été réalisée avec un suivi journalier des animaux et la mise en place des mesures compensatoires si nécessaire.

2.5. Supplémentation en phosphore et en calcium

Pour induire la calcification valvulaire, un régime alimentaire spécial a été associé avec le modèle d'insuffisance rénale chronique induit par une néphrectomie des 5/6^{ème}. Les animaux des groupes 5/6 Nx (WT et sEH-P-KI) ont été autorisés à se nourrir à volonté avec un régime alimentaire supplémenté en calcium et en phosphate. Ce régime correspond à 1% de calcium total et 1,8% de phosphore total, fourni par la société Safe (Augy, France). Les rats ont été maintenus sous ce régime jusqu'au moment du sacrifice, qui a eu lieu 11 semaines après l'intervention chirurgicale. Les groupes d'animaux contrôles ont été soumis à un régime standard contenant des niveaux normaux de calcium et de phosphore. Ce régime contenait 1% de calcium total et 0,9% de phosphore total, également fournis par la société Safe.

3. Etude de la fonction et de la structure cardiaques

3.1. Echocardiographie transthoracique

Les mesures échocardiographiques ont été réalisées à l'âge de 3, 6 et 9 mois au moyen d'un échographe Vivid7 Ultrasound (General Electric Healthcare, Chicago, Illinois, États-Unis). L'échographe est équipé d'une sonde de cardiologie pédiatrique GE 6S-RS pour les acquisitions morphologiques et Doppler. L'analyse des images a été réalisée avec le logiciel Echopac PC (General Electric Healthcare).

Pour procéder à l'échocardiographie, les animaux ont d'abord été anesthésiés par de l'isoflurane 1% (ISO-VET Piramal Healthcare) en cage à induction, puis tondu au niveau de l'hémithorax gauche. Les rats étaient ensuite placés sur une plaque chauffante à 37°C pour éviter l'hypothermie. La concentration en isoflurane a été adaptée si besoin afin de garder une fréquence cardiaque entre 250 à 600 bpm tout en permettant une sédation suffisante.

L'acquisition des mesures en mode temps-mouvement a été réalisée en coupe parasternale petit axe passant par les piliers de la valve mitrale.

Les épaisseurs des parois antérieure et postérieure, ainsi que les diamètres du ventricule gauche (VG) ont été mesurés en téléstole (DtSVG) et en télédiastole (DtDVG) afin de calculer la fraction de raccourcissement (FR), paramètre reflétant la fonction contractile du VG. $FR (\%) = \frac{DtDVG - DtSVG}{DtDVG} \times 100$

L'analyse doppler en mode pulsé permet de visualiser et de mesurer les vitesses de déplacement des flux sanguins au sein des cavités cardiaques et des vaisseaux. La sonde était placée au niveau de l'aorte thoracique pour visualiser le flux sanguin sortant du VG. Les mesures de la fréquence cardiaque (FC, battements/minute) et de l'intégrale temps-vitesse (ITV, cm) permettent de calculer le volume d'éjection systolique (VES, mL) qui représente la capacité du VG à éjecter le sang vers le système périphérique : $VES = ITV \text{ aortique} \times \pi \times C D^2 \text{ aortique}$. Le débit cardiaque (DC mL/minute) a été calculé de la façon suivante :

$$DC = VES \times FC$$

L'analyse doppler en mode tissulaire a permis la visualisation et l'évaluation de la fonction diastolique dans la vue apicale à quatre chambres. La mesure nous a permis de calculer le rapport E/e' impliquant de mesurer l'onde E du flux transmitral et l'amplitude de la vitesse l'onde Ea ou e' (au niveau de l'anneau mitrale). Le calcul du rapport E/e' a été utilisé pour estimer la fonction diastolique.

3.2. Evaluation de la fibrose cardiaque

Par une incision médiane du sternum, après la mise à mort des animaux, le cœur des rats a été prélevé. Une fois les cavités cardiaques disséquées, le VG a été subdivisé en trois sections distinctes : une partie supérieure réservée à l'analyse de l'expression protéique, l'apex dédié à l'étude de l'expression d'ARNm, et une section médiane consacrée à l'analyse histologique. Cette dernière a été mise dans du milieu de congélation pour tissus (TFM, Microm Microtech) puis rapidement plongée dans l'azote liquide avant d'être congelée à une température de -80°C. Par la suite, des coupes d'une épaisseur de 7 µm ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Microm HM 525, Microm Microtech).

Les coupes de VG ont été décongelées pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, elles ont été plongées dans un bain de liquide de Bouin (Q Path VWR) pendant 30 minutes à température ambiante. La solution de rouge Sirius était préparée par dilution de 0,1g de rouge Sirius (Direct Red 80, Thermoscientific) dans 100 mL d'acide picrique à saturation dans de l'eau distillée. Les coupes ont été immergées dans un bain de rouge Sirius pendant 45 minutes à température ambiante. Elles ont été ensuite rincées rapidement dans un bain d'eau. Les coupes ont été déshydratées par allers-retours rapides dans un bain d'alcool 95% puis dans trois bains d'alcool à 100%. Enfin, elles ont été passées dans un bain de xylène puis aussitôt montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage (Q Path Coverquick 2000, VWR).

Afin de quantifier de la fibrose ventriculaire cardiaque, les coupes de VG colorées ont été observées au microscope optique (Axioskop, Zeiss) et des photos au grossissement x20 ont été effectuées. La fibrose a été mesurée en utilisant le logiciel ImageJ par calcul du pourcentage de l'aire occupée par le collagène sur l'aire totale de la coupe du VG.

4. Evaluations valvulaires aortiques

4.1. Mesures échocardiographiques

La mesure du diamètre de l'écart intersigmoïdien (cm) a été évalués en mode temps-mouvement en coupe parasternale grand axe. L'analyse en doppler continu en couple apicale a permis de mesurer le gradient moyen (AoGmax, mmHg) et le jet de vélocité maximale (AoVmax, m/s).

4.2. Histologie et immunohistochimie

La section supérieure réservée à l'analyse de l'expression protéique a été subdivisée en deux parties. La première partie, associée à l'aorte, a été utilisée pour la dissection de la valve aortique. La valve aortique a été par la suite incubée, à 4°C toute la nuit, avec une sonde d'imagerie fluorescente (IVISense Osteo NIR bisphosphonates) qui est spécifiquement conçue pour présenter une forte affinité envers l'hydroxyapatite. A l'issue de l'incubation, trois lavages de la valve aortique au PBS 1X ont été effectués. Ensuite, la valve aortique a été immergée dans un milieu de congélation pour tissus (TFM, Microm Microtech) et rapidement refroidie en la

plongeant dans de l'azote liquide avant d'être stockée à une température de -80°C. Des coupes d'une épaisseur de 14 µm ont été préparées en utilisant un cryostat (Microm HM 525, Microm Microtech). Ces coupes de la valve aortique ont été examinées sous un microscope optique (Axioskop, Zeiss) afin d'identifier une coupe complète contenant les trois feuillets valvulaires. Par la suite, ces coupes ont été conservées à une température de -80°C. Les coupes de valves aortiques ont été observées au microscope optique (Axioskop, Zeiss) et une photo de la valve aortique entière a été effectuée. Un montage entre lame et lamelle a été effectué avec un milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield, Vector Laboratories), permettant de marquer les noyaux. Les calcifications valvulaires ont été observées au microscope à fluorescence (AxioImager J1, Zeiss). La calcification a été évaluée en utilisant le logiciel ImagJ par calcul du pourcentage de l'aire occupée par le collagène ou les calcifications sur l'aire totale de la valve aortique.

Les immunomarquages tissulaires ont été réalisés sur les coupes de valves aortiques préalablement décrites. Les macrophages ont été visualisés par marquage de la glycoprotéine CD68. Les coupes ont été décongelées 5 minutes à température ambiante puis ont été fixées par immersion dans un bain d'acétone (Thermoscientific) pendant 10 minutes. Les coupes ont été ensuite réhydratées avec du PBS 1X (10 minutes) puis recouvertes d'une solution composée de BSA 3% (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) et de saponine 0,3% (Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes afin de saturer les sites non-spécifiques de marquage et de perméabiliser les membranes. L'anticorps primaire (CD68 1/800ème Rat BioRad, MCA341R) a été incubé une heure à température ambiante. Les coupes ont été ensuite rincées plusieurs fois avec du PBS 1X, puis l'anticorps secondaire (anticorps d'âne anti-rat couplé au FITC 1/400ème Jackson, 712-545-153) a été incubé pendant 30 minutes à température ambiante. Les coupes ont été rincées plusieurs fois avec du PBS 1X avant d'être montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield, Vector Laboratories), permettant de marquer les noyaux. Les coupes de valves aortiques ont été observées au microscope à fluorescence (AxioImager J1, Zeiss) au grossissement x20. L'inflammation a été évaluée par comptage des macrophages par valve aortique.

5. Evaluation de la fonction rénale

5.1. Mesure du débit de filtration glomérulaire

Une mesure transdermique du débit de filtration glomérulaire (DFG) a été effectuée. Le système de mesure est composé d'un détecteur de fluorescence directement attaché sur le dos de l'animal conscient et qui se déplace librement dans sa cage. Ce détecteur permet de mesurer et d'enregistrer la cinétique d'excrétion du traceur exogène injecté chez l'animal à savoir la sinistrine conjuguée à la fluorescéine (FITC), un analogue de l'inuline.

5.2. Histologie rénale

Des sections sagittales de rein gauche ont été immergées dans une solution de formol à 4% pendant une période de 24 heures. Par la suite, elles ont été incluses dans de la paraffine après avoir suivi un processus de traitement conventionnel, comprenant la déshydratation à l'alcool. Des coupes d'une épaisseur de 3 µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome et colorées en utilisant une solution de trichrome de Masson. Les lames ont ensuite été réalisées de manière randomisée afin de déterminer le degré des lésions histologiques rénales. Pour cette évaluation, une échelle de notation de 0 à 4 a été utilisée pour évaluer le niveau de l'inflammation interstitielle, la fibrose interstitielle et la glomérulosclérose à un grossissement x20 (0 : pas de dommage ; 1 : moins de 25 % ; 2 : entre 25 % et 50 % ; 3 : entre 50 % et 75 % ; 4 : entre 75 % et 100 %). Les lésions tubulaires ont été constatées à un grossissement x10. La fibrose vasculaire a été analysée à un grossissement de x40. Il convient de noter que la moitié supérieure du rein n'a pas été utilisée en raison de son état ischémique dans le groupe de rat soumis à une néphrectomie des 5/6^{ème}.

5.3. Dosages plasmatiques

Afin d'avoir un suivi de l'insuffisance rénale chronique, le sang a été récolté pendant (S4/ S5 post-chirurgie) et à la fin du protocole expérimental (S8/ S10). Le sang total est récupéré et centrifugé pendant 10 min à 1500 g et le plasma généré est aliquoté et congelé à -80 °C. Différents paramètres biochimiques ont été mesurés tels que la créatinine, le calcium, le potassium et le phosphore.

5.4. Cages métaboliques et dosages urinaires

Les animaux ont été placés dans des cages métaboliques afin de récolter les urines des 24h (après 24 h d'habituation dans ces cages). A l'issue des 24h, le volume urinaire et de consommation hydrique ont été mesurés. Les échantillons urinaires ont été récoltés et ont été stockés à -20 °C jusqu'au moment du dosage des différents paramètres biochimiques.

6. Evaluation de la fonction endothéliale et de la pression artérielle

6.1. Mesure de la dilatation endothélium-dépendante

Après la mise à mort des animaux, la dilatation endothélium-dépendante en réponse au flux a été mesurée au niveau de l'artère mésentérique de 2ème ordre. Brièvement, le mésentère a été prélevé et mis dans un tampon frais (solution de Krebs oxygénée). Un segment de 2 à 3 mm du 2ème ordre a été ensuite disséqué puis monté sur un artériographe d'Halpern (DMT, Danemark). Dans un premier temps, les artères ont été pré-constrictées par l'ajout de phényléphrine à une concentration finale de 10^{-5} M. Par la suite, l'augmentation du flux intraluminal (0,5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 μ L/min) a permis d'évaluer la dilatation endothélium-dépendante en réponse du flux.

6.2. Mesure de la pression artérielle

Au moyen de la pléthysmographie à la queue (CODA, Kent scientific Corporation, Torrington, CT, USA), la mesure non invasive de la pression artérielle systolique a été réalisée. Cette procédure a été effectuée à 10 semaines post-chirurgie chez des rats conscients préalablement habitués et entraînés. Pour chaque animal, la valeur de pression systolique a été obtenue par le calcul de la moyenne de deux séries de 10 cycles de mesures.

7. Dosage du calcium direct : méthode o-crésolphthaléine

Le calcium a été mesuré de manière directe par la méthode du dosage au o-crésolphthaléine dont le principe repose sur la formation d'un complexe entre le calcium et l'orthocrésolphthaléine. Pour ce faire, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X et incubées avec du HCl 0,6N toute la nuit sous agitation constante à +4°C. Le surnageant de décalcification était récupéré et déposé dans une plaque 96 puits (Falcon) puis une lecture au spectrophotomètre à 565nm (Spark® Multimode microplate reader, Tecan) était réalisée. La quantité de calcium a été calculée à partir d'une courbe de calibration. De la même manière, les concentrations de calcium ont été mesurées dans des surnageants de décalcification des anneaux aortiques (aorte abdominales) mises en culture *ex vivo*. Les taux de calcium ont été calculés par la suite pour chaque échantillon après normalisation sur le poids sec du tissu.

8. Les inhibiteurs pharmacologiques

Le tableau 2 résume l'ensemble des molécules pharmacologiques utilisées dans cette étude et dirigées contre la sEH-P, la NO- synthase et le récepteur PPAR γ .

Inhibiteurs	Concentration	Références
N-Acetyl-S-farnesyl-L-cysteine (AFC), sEH-P	0.84 \pm 0.9 μ M	63270, Cayman Chemical Company
4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)butanoic acid (SWE101), sEH-P	0.058 \pm 0.005 μ M	
T0070907 (PPAR γ)	1 μ M	Tocris Bioscience
Nw-Nitro-L-arginine (L-NNA)	100 μ M	Sigma-Aldrich

Tableau 2 : Molécules pharmacologiques utilisées

9. RT- QPCR quantitative

9.1. L'extraction d'ARNs totaux

Les ARNs totaux ont été extraits par l'ajout de 1mL de TRIzol (Life technologies) et les échantillons ont été homogénéisés pendant 5 minutes à température ambiante. A la suite de cette étape, 300µL de chloroforme (Sigma-Aldrich) a été ajouté. Les tubes ont été vortexés puis incubés à nouveau à température ambiante pendant 2 à 3 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 12000g pendant 15 minutes à +4°C. L'ensemble des manipulations a été réalisé sur glace. La phase aqueuse a été transférée dans un nouvel Eppendorf et l'ARN était précipité par ajout de 500 µL d'isopropanol (Fisher BioReagents). Les tubes ont été brièvement vortexés et incubés 10 minutes à température ambiante. Après une centrifugation à 12000g pendant 15 minutes à +4°C, le précipité d'ARN formait un culot colloïdal au fond du tube. Le surnageant a été jeté et l'ARN a été lavé par ajout de 1 mL d'éthanol à 75% (Fisher BioReagents). Les tubes ont été agités puis centrifugés à 7500g pendant 5 minutes à 4°C. Les lavages ont été répétés trois fois. Lors du dernier lavage, le surnageant était jeté et le culot brièvement séché à l'air libre. Les ARNs ont été resuspendus dans 30µL d'eau RNase free (Life technologies). La qualité et la quantité des ARNs étaient évaluées par dosage au Nanodrop (Nanodrop 2000, ThermoScientific). Les ARNs ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

9.2. Le traitement à la DNase

Après l'extraction des ARNs totaux il peut persister une présence d'ADN pouvant biaiser les résultats. Un traitement à la DNase I (Invitrogen) a été effectué afin de débarrasser l'ARN de toute contamination éventuelle. Deux microgrammes d'ARN ont été prélevés et complétés à 16 µL d'eau RNase free. Un mix comprenant 2 µL de DNase I et 2 µL de tampon 10X était ajouté à chacun des échantillons. Les tubes ont été incubés 15 minutes à température ambiante. Deux microlitres d'EDTA ont été ajoutés à chaque échantillon puis les tubes ont été placés 10 minutes à 65°C. Les échantillons ont été à nouveau dosés au Nanodrop avant d'être conservés à -20°C.

9.3. Transcription inverse

Après le traitement à la DNase I, 1 µg d'ARN était déposé dans un tube et complété avec 16,75 µL d'eau RNase free. Un mix préparé de la façon suivante a été ajouté à chacun des échantillons : - 3 µL de dNTP (10mM, Invitrogen) - 2,5 µL de random primers (0,75 µg/µL, Invitrogen) - 0,75 µL de RNase OUT (40U/µL, Invitrogen) - 5 µL de tampon 5X (M-MLV RT Buffer, Invitrogen) Les tubes ont été ensuite incubés 5 minutes à 65°C. Un microlitre de transcriptase inverse (MMLV reverse transcriptase 200U/µL, Invitrogen) était ajouté dans chacun des tubes avant d'être placés une heure à 37°C. Les échantillons ont été enfin incubés 5 minutes à 95°C pour dénaturer l'enzyme. Les produits de la transcription inverse ont été conservés à -20°C avant d'être utilisés.

9.4. PCR quantitative

Les produits issus de la réaction de transcription inverse ont été amplifiés par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) grâce à un appareil de RT-qPCR (Light Cycler LC480, Roche). La qPCR permet le suivi en temps réel de l'amplification grâce à la détection de la fluorescence émise par le SYBR Green (Roche), un agent intercalant de l'ADN double brin néo-formé¹⁴¹. La fluorescence émise par le SYBR Green est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. Pour procéder à l'amplification, un mix a été préparé de la façon suivante :

- 1,5 µL d'eau RNase free
- 0,5 µL de l'amorce sens du gène d'intérêt
- 0,5 µL de l'amorce anti-sens du gène d'intérêt
- 5 µL de SYBR Green I

7,5 µL de ce mix ont été déposés dans chaque puit d'une plaque 96 puits (Corning) préalablement déposée sur un bloc froid. Les échantillons de la réaction de transcription inverse ont été dilués au 1/10ème dans de l'eau RNase free, puis 2,5 µL de chaque échantillon dilué a été déposé dans la plaque 96 puits pour chacun des gènes d'intérêts étudiés. La plaque était ensuite centrifugée quelques secondes à 500g à +4°C puis placée dans l'appareil de PCR quantitative (Light Cycler LC480, Roche). La PCR quantitative se déroulait selon la

programmation référencée dans le tableau 9. Le logiciel LightCycler LC480 permet de calculer la concentration d'ADNc cible grâce à la réalisation d'une gamme de dilution établie par un mélange d'ADNc de chacun des échantillons étudiés. Les résultats obtenus ont ensuite été standardisés par rapport au gène de ménage.

10. Analyses statistiques

Selon la distribution de la variable, les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm écart-type (SD, standard deviation) ou médiane (25^{ème} et 75^{ème} interquartile). La normalité des distributions a été évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Dans le cas d'une distribution normale, les tests paramétriques ont été appliqués. Dans le cas contraire, nous avons utilisées des tests non-paramétriques. Les comparaisons entre deux groupes ont été effectuées à l'aide du test de Student lorsque la distribution suivait une loi normale, ou par un test de Mann-Whitney dans le cas contraire. Pour les comparaisons de trois groupes et plus, le test nonparamétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé. Des valeurs de $P < 0,05$ étaient considérées comme significatives. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels GraphPad Prism (version 9.0).

Résultats et discussion

Étude 1

Effet de l'inhibition de l'activité de la sEH-P sur le développement des calcifications vasculaires

Inhibiting the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase reduces arterial calcification

Hind MESSAOUDI¹, Olivier VARENNE², Elodie BERG¹, Nicolas PERZO¹, Thomas DUFLOT^{1,3}, Ghiles CHEGRANI¹, Guillaume FEUGRAY, Thomas LEVESQUE^{1,4}, Gilles KAUFFENSTEIN⁵, Valéry BRUNEL⁶, Isabelle SIX², Romuald MENTAVERRI², Vincent RICHARD^{1,3}, Ignacio ANEGON⁷, Christophe MORISSEAU⁸, Saïd KAMEL², Eugen PROSCHAK⁹, Jérémy BELLIE^{1,3}

¹Univ Rouen Normandie, Inserm, EnVI UMR 1096, F-76000 Rouen, France

²EA 7517, Mécanismes Physiopathologiques et conséquences des calcifications cardiovasculaires (MP3CV), Centre de Recherche Universitaire en Santé, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

³Department of Pharmacology, CHU Rouen, F-76000 Rouen, France

⁴Department of Cardiology, CHU Rouen, F-76000 Rouen, France

⁵Inserm UMR 1260, CRBS, Strasbourg University, Strasbourg, France

⁶Department of General Biochemistry, CHU Rouen, 76000 Rouen, France

⁷Nantes Université, CHU Nantes, Inserm, CNRS, SFR Santé, Inserm UMS 016,

CNRS UMS 3556, F-44000 Nantes, France.

⁷Nantes Université, CHU Nantes, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, F-44000 Nantes, France

⁷Transgenesis Rat ImmunoPhenomic Platform, F-44000 Nantes, France.

⁸Department of Entomology and Nematology, and UCD comprehensive Cancer Center, University of California, Davis, CA

⁹Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe-University, Max-von-Laue-Str. 9, D-60438 Frankfurt am Main, Germany.

ABSTRACT

Background. Increasing evidence suggests that the bifunctional soluble epoxide hydrolase (sEH) regulates vascular calcification. This study addressed the hypothesis that the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase (sEH-P) is involved in this regulation.

Methods and results. Pharmacological and genetic inhibition of sEH-P reduced the increase in calcium deposition in rat aortic rings cultured in high-phosphate conditions. This was associated with a decreased mRNA expression of the osteochondrogenic marker *Msx2* and *Sox9*. The deendothelialization of aortic rings abolished this anti-calcifying effect and the calcification of human aortic smooth muscle cells was not affected by sEH-P inhibition, suggesting a major role of the endothelium. On one hand, endothelial NO release appeared not involved since the level of its metabolite nitrite was not increased during sEH-P inhibition and the inhibition of NO-synthase did not prevent the anticalcifying effect of sEH-P inhibition. On the other hand, an increased level of the calcification inhibitor pyrophosphate anions (PPi) was observed in the culture supernatant of aortic rings when sEH-P is inhibited and *in vitro* experiments demonstrated that PPi is released by human aortic endothelial cells and can be metabolized by sEH-P. In addition, the blockade of PPAR γ , which mediate the intracellular effect of the sEH metabolites lysophosphatidic acids, reduced the anticalcifying effect of sEH-P inhibition. Finally, the aortic calcification associated with chronic kidney disease induced by subtotal nephrectomy was reduced in sEH-P-deficient rats compared with wild-type rats. This was associated with a prevention of the development of vascular dysfunction and cardiac remodeling.

Conclusion. These results show that the inhibition of sEH-P prevents the development of vascular calcification by reducing the degradation of PPi and LPA-mediated activation of PPAR γ , representing a promising therapeutic approach to limit the development of the cardiovascular complications of patients with chronic kidney disease.

Keywords: vascular calcification, chronic kidney disease, soluble epoxide hydrolase phosphatase, pyrophosphate anion

INTRODUCTION

Vascular calcification is an ectopic calcification resulting from an imbalance between promoters and inducers of the osteochondrogenic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells (VSMC) (1-4). Medial calcification is commonly observed in patients with chronic kidney disease (CKD) and diabetes (1-4). The extent and severity of arterial calcification contribute to the high prevalence of cardiovascular morbidity and mortality during these diseases (1-4). Currently, no specific therapeutic strategies are available for preventing or treating the development of vascular calcification, highlighting an urgent therapeutic need.

In this context, soluble epoxide hydrolase (sEH) could be a new potential therapeutic target. The sEH is a bifunctional enzyme notably expressed in endothelial cells and VSMC (5-7). It hydrolyzes by its C-terminal domain (sEH-H) cytochrome-derived epoxyfatty acids, in particular epoxyeicosatrienoic acids (EETs) that display potent anti-inflammatory and vasodilating properties, to corresponding diols, the dihydroxyeicosatrenoic acids (DHETs) (5-7). In addition, sEH possesses a less studied phosphatase activity (sEH-P) on its *N*-terminal domain that is notably involved in the degradation of intracellular lysophosphatidic acids (LPAs) to monoacylglycerols and contributes to the regulation of cardiometabolic homeostasis (8,9). Pharmacological inhibition of sEH-H has emerged as a new therapeutic strategy to prevent the cardiovascular complications associated with various diseases by restoring EET bioavailability (5-7). Nevertheless, we observed that EETs may potentiate aortic calcification *ex vivo* and therefore that in this particular context, sEH is protective by hydrolyzing EETs (10). However, sEH knockout was recently shown to prevent the development of aortic calcification including *in vivo* in a mouse model of chronic kidney disease (11). In addition, the sEH Arg287Gln polymorphism that is known to decrease sEH-H activity towards EETs has been shown to be associated with the presence of coronary and carotid artery calcified plaques (12,13). Since this genetic polymorphism also decreases sEH-P activity towards LPA (14),

these results suggest that the inhibition of sEH-P could be protective against vascular calcification.

In this context, this study aimed to assess the effects and the mechanisms associated with the pharmacological and genetic inhibition of sEH-P in cell and tissue calcification assays and in an *in vivo* model of CKD-induced vascular calcification.

METHODS

An expanded detailed description of Methods section is available in the online-only Data Supplement.

Animal experiments

Experiments were performed in 12-week old male wild type (WT) Sprague-Dawley rats and rats with a specific inactivation of sEH-P activity, generated using the CRISPR-Cas9 technology as previously described (9), (Janvier Labs, France). All animal studies were approved by the Animal Ethics Committee (CENOMEXA #24107) and performed in accordance with the care and use of laboratory Animal's guide.

For *ex vivo* mineralization assays, rats were euthanized by intraperitoneal injection of pentobarbital (120 mg/kg), and the thoracic and abdominal aortas were dissected as previously described (10). After removal of fat and connective tissues, the vessels were cut into 2- to 3-mm rings and placed in regular medium (DMEM 6546, Sigma-Aldrich), containing 0.9 mM inorganic phosphate (Pi), or in high-phosphate DMEM with 3.8 mM Pi to induce vascular calcification, supplemented with 10% FBS at 37°C in 5% CO₂ for 7 consecutive days. The medium was changed at days 3 and 6.

For *in vivo* experiments, WT and sEH-P KI rats were submitted to a two-step surgical procedure to induce CKD or a sham surgery. The first step of the surgical procedure consisted in the ligation of the upper branch of the left kidney artery, followed by a cauterization of the lower pole of the left kidney, leading to 2/3 of non-functioning left kidney. One week later, the right kidney was removed, inducing 5/6 nephrectomy (5/6 Nx). Sham animals underwent laparotomy and manipulation of both kidneys, without removing them, before wound closure. Assessment of cardiovascular and renal parameters was performed 10 weeks after surgery.

Human VSMC experiments

Human arterial tissues were obtained from patients undergoing aortic surgery, who gave written informed consent, and studies were conducted in accordance with the Principles of Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki and approved by the local ethical committees (Protocol number 2009-19). Aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) were isolated from aortic lesion-free explants as previously described (10). For mineralization assays, human VSMC were cultured between P3 and P8 (100 000 cells/well; 6-well plates) in regular (0.9 mM Pi) or high-phosphate DMEM (3 mM Pi) supplemented with 1% FBS at 37°C in 5% CO₂ for 14 consecutive days. The medium was changed every 2 to 3 days.

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism software 8.0.2. Group effects were determined by one-way ANOVA or repeated measures ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test unless differentially indicated. Data are presented as mean ± SEM values. Two-sided *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Ex vivo an in vitro experiments

Inhibition of sEH-P, using *N*-acetyl-S-farnesyl-L-cysteine (AFC) (15), induced a dose-dependent decrease in the calcium content of aortic rings cultured in high-phosphate conditions (Figure 1A). As illustrated by Alizarin red and Von Kossa staining (Figure 1B), this effect was obtained since the concentration of 1 μ M that was shown to not reduce aortic viability in contrast to 10 μ M AFC (Supplementary Figure 1). AFC at 1 μ M also prevented the increase in the mRNA expression levels of the osteochondrogenic markers *Msx2* and *Sox9* without modifying *SMMHC* and *Runx2* mRNA expression levels (Figure 1C). In addition, AFC increased the level of the calcification inhibitor pyrophosphate anions (PPi) in the culture supernatant of aortic rings cultured in high-phosphate conditions (Figure 1D). Although the increase in the 18:1 MAG-to-18:1 LPA ratio without change in 14,15-DHET-to-14,15-EET ratio in the culture supernatant (Supplementary Figures 2A and 2B) suggested the efficient inhibition of sEH-P activity and no change in sEH-H activity with 1 μ M AFC, we confirmed the anticalcifying effect of sEH-P inhibition using the recently-developed and more specific sEH-P inhibitor SWE101 (Figure 1E) (16). In addition, aortic rings isolated from sEH-P knock-in (KI) rats, generated using the CRISPR-Cas9 technology as previously described (9), were less prone to calcify compared to aortic rings isolated from control wild-type (WT) rats when cultured in similar high-phosphate conditions (Figure 1F).

Then, we explored the mechanism that could be involved in the prevention of calcification associated with sEH-P inhibition. First of all, deendothelialization of aortic rings prevented the effect of AFC against calcium deposition (Figure 2A). In addition, AFC did not affect high-phosphate-induced calcification of primary human aortic smooth muscle cells (HASMC) and VSMC isolated from KI and WT rats similarly calcified when cultured in high-phosphate conditions 2B and 2C). This demonstrates that the endothelium plays a major role in the anticalcifying effect associated with sEH-P inhibition. However, an interaction between sEH-P and endothelial NO-synthase (eNOS), previously suggested

from *in vitro* experiments (17,18), appeared not involved. Indeed, the concentration of the NO metabolite nitrite in the culture supernatants were not affected by AFC and the addition of the eNOS inhibitor N ω -Nitro-L-arginine (L-NNA) did not reverse the impact of AFC on aortic calcium deposition (Supplementary Figure 3A and 3B). Based on the previously-demonstrated efficiency of sEH-P to metabolize molecules containing a pyrophosphate moiety (8) and the increase in PPi associated with sEH-P inhibition, kinetic experiments were performed on recombinant sEH. We demonstrated that rat and human sEH are efficient in hydrolyzing PPi and that this hydrolysis is reduced when inhibiting sEH-P with SWE101 (Figure 3A, 3B and 3C). Moreover, we observed that human aortic endothelial cells (HAEC) cultured in standard conditions release PPi over time (Figure 3D). Furthermore, addition of exogenous LPA did not affect aortic ring calcification induced by high-phosphate even if sEH-P is inhibited (Supplementary Figure 4), but the blockade of PPAR γ , which mediate the effects of intracellular LPA (9,19), using the cell-permeable antagonist T0070907 (9,20) abolished the prevention of aortic ring calcification by SWE101 (Figures 4A and 4B). Altogether, these results strongly support the hypothesis that the anticalcifying effect of sEH-P inhibition is due to a reduced degradation of PPi produced by endothelial cells and of intracellular LPA mediating PPAR γ activation.

***In vivo* experiments**

To assess whether sEH-P inhibition is effective in preventing vascular calcification *in vivo*, we induced chronic kidney disease (CKD) by subtotal nephrectomy in sEH-P KI rats and control WT rats. We first confirmed the efficient inhibition of sEH-P activity in the renal tissue of knock-in rats without significant change in sEH-H activity (Supplementary Figure 5). Over the 10-week follow-up period after surgery, mortality rate was similar in sEH-P knock-in rats and control rats (Supplementary Figure 6) and CKD developed similarly in both strains, as shown by the parallel increase in plasma creatine and urea, the reduction of glomerular filtration rate, estimated using transdermal measurement of FITC-sinistrin clearance, and the increased albuminuria in nephrectomized WT and KI rats compared to

corresponding sham-operated rats (Figures 5A, 5B, 5C and 5D). In addition, the degree of polyuria and polydipsia degree were similar in both strains (Supplementary Figures 7A and 7B) as well as histological lesions (Supplementary Figure 8).

In this context and despite the absence of change in the blood calcium-phosphate product (Supplementary Figure 9), nephrectomized WT rats displayed aortic calcification, as shown by the increase in aortic calcium content and Alizarin red staining compared to sham-operated rats (Figures 6A and 6B). Importantly, the development of aortic calcification was fully prevented in sEH-P knock-in rats (Figures 6A and 6B). In addition, the degree of vascular dysfunction associated with CKD was lesser in sEH-P knock-in rats compared to WT rats (Figures 6C). At the cardiac level, left ventricular (LV) hypertrophy and dilatation were reduced in nephrectomized sEH-P knock-in rats compared to nephrectomized WT rats, as shown by the decrease in the LV weight-to-tibia length ratio and in end-diastolic LV wall thickness and LV diameter (Figures 6D and 6E). In addition, sEH-P KI partially prevented the development of LV fibrosis induced by nephrectomy (Figure 6F). In contrast, sEH-P knock-in did not appear to prevent the development of cardiac diastolic dysfunction, illustrated by the increase in the E/e' ratio with nephrectomy (Figure 6G), without change in systolic function *i.e.*, cardiac output and fractional shortening (Figures 6H and 6I).

DISCUSSION

The major finding of the present study is that sEH-P is involved in vascular calcification through the degradation of PPI together with LPA-mediated PPAR γ activation.

First, *ex vivo* experiments demonstrated that the pharmacological or genetic inhibition of sEH-P reduce the calcification of rat aortic rings submitted to high-phosphate conditions. This was notably associated with a prevention of the increase in mRNA expression levels of Msx2 and Sox9 induced by high-phosphate, showing a decrease in the osteochondrogenic transition of VSMC. The osteogenic factor Msx2 and the chondrogenic factor Sox9 exert opposite effects on Runx2 expression level that may explain the absence of significant effect of sEH-P on its expression (21). In fact, we previously observed that inhibition of sEH-H enhances Runx2 expression (10), while inhibition of sEH-P downregulates Msx2 and Sox9, which act upstream of Runx2 (21), we can hypothesize that sEH phosphatase domain exerts its deleterious role at an early stage of the vascular calcification process while the role of the sEH hydrolase domain may be more important thereafter. In this way, no change in Msx2 and Sox9 expression levels was observed in human carotid calcified plaques, while Runx2 expression was markedly increased and inversely correlated with sEH expression (10), supporting a more marked impact of the hydrolase domain at this advanced stage of the disease.

Next, the absence of a preventive effect of sEH-P inhibition on deendothelialized aortic rings and on human and rat VSMC strongly supports the hypothesis that endothelium-dependent mechanisms are involved in the anticalcifying effect of sEH-P, as previously shown for sEH-H that metabolizes the procalcifying endothelial factors EETs (10). We cannot demonstrate that the potentiation of eNOS pathway, which may prevent vascular calcification (22,23) is involved in the effects of sEH-P inhibition, in contrast to what was previously observed in endothelial cells stimulated with VEGF or statins (17,18). Next, we focused on PPI that is a known direct inhibitor of the formation and growth of phosphate-calcium crystals, mainly hydroxyapatite (24-26). We demonstrated that PPI is a natural substrate of sEH-P and gave evidences that the prevention of PPI degradation originated from endothelial cells is a

main mechanism involved in the anticalcifying effects of sEH-P inhibition. This suggests that sEH is the main enzyme involved in the catabolism of intracellular PPI, while tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) mediates its degradation at the extracellular level, and that both pathways regulate Pi/PPI balance and vascular mineralization (26). Furthermore, as previously shown for the potentiating effect of sEH-P inhibition on thermogenesis (9), blockade of the LPA intracellular receptors PPAR γ also alleviates this anticalcifying effect. This result is consistent with numerous studies showing the preventive effect of PPAR γ activation against vascular calcification through downregulation of the Wntless and Int-1 (WNT) signaling pathway (27,28). Interestingly, these two substrates of sEH-P PPI and LPA are formed by enzymes of the same family that are the ectonucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (eNPP1 and eNPP2, also termed autotaxin, respectively). Although a similar role for eNPP1 and eNPP2 at the intracellular level remains elusive, many other enzymes/enzymatic pathways contribute to the intracellular production of PPI and LPA (29,30).

Furthermore, in the absence of modification in the degree of renal alterations induced by subtotal nephrectomy, the comparison of WT and sEH-P KI rats allowed to finally demonstrate that the inhibition of sEH-P efficiently prevents the development vascular calcification *in vivo*. These data extend recent results showing that sEH also regulate vascular calcification by interacting with and regulating Sirtuin-3 expression (11). Thus, part of the decrease in aortic calcification observed in sEH knockout mice fed a high adenine and phosphate diet may be also at least partly related to the suppression of sEH-P activity (11). Importantly, the preventive effect of sEH-P against vascular calcification in the present work was associated with an improvement in vascular function and cardiac remodeling, further highlighting the interest of this therapeutic approach in the context of CKD.

Altogether our results show that sEH-P contributes to the development of vascular calcification by the degradation of the mineralization inhibitor PPI in endothelial cells and by reducing LPA-mediated activation of PPAR γ . It appears thus that sEH plays a dual role on the vascular calcification process with opposite roles of its phosphatase and hydrolase domains, the latter previously shown to be rather

protective limiting EET-mediated increase in TNAP activity (9) (Graphical abstract). Moreover, this study demonstrates that sEH-P inhibition represents a unique therapeutic opportunity to prevent vascular calcification in aging and in diseases such as CKD, and to finally help improving the cardiovascular prognosis of patients. In this way, the need for the development of new orally-available specific sEH-P inhibitors appears of crucial importance.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the European Union with European Regional Development Fund (FEDER) and by Région Normandie in the framework project ENTRAC. H.M. was recipient of Normandy Regional Council fellowship. This work was also supported by grants from the French Government, managed by the National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’avenir” with the reference ANR-16-RHUS-0003, the GCS G4 (FHU CARDiac Research Network on Aortic VALve and heart failure - CARNAVAL) and the National Institute of Environmental Health Sciences (R35 ES030443 and P42 ES004699).

REFERENCES

1. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res.* 2011;109:697-711.
2. Leopold JA. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification. *Trends Cardiovasc Med.* 2015;25:267-274.
3. Boström KI. Where do we stand on vascular calcification? *Vascul Pharmacol.* 2016;84:8-14.
4. Lee SJ, Lee IK, Jeon JH. Vascular Calcification-New Insights Into Its Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2020;21:2685.
5. Bellien J, Joannides R, Richard V, Thuillez C. Modulation of cytochrome-derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: a promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? *Pharmacol Ther.* 2011;131:1-17.
6. Morisseau C, Hammock BD. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:37-58.
7. Kramer J, Proschak E. Phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2017;133:88-92.
8. Morisseau C, Schebb NH, Dong H, Ulu A, Aronov PA, Hammock BD. Role of soluble epoxide hydrolase phosphatase activity in the metabolism of lysophosphatidic acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;419:796-800.
9. Leuillier M et al. CRISPR/Cas9-mediated inactivation of the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase prevents obesity and cardiac ischemic injury. *J Av Res.* 2023;43:163-174.
10. Varennes O, Mentaverri R, Dufлот T, Kauffenstein G, Objois T, Lenglet G, Avondo C, Morisseau C, Brazier M, Kamel S, Six I, Bellien J. The metabolism of epoxyeicosatrienoic acids by soluble epoxide hydrolase is protective against the development of vascular calcification. *Int J Mol Sci.* 2020;21:4313.

11. He W, Huang J, Liu Y, Xie C, Zhang K, Zhu X, Chen J, Huang H. Deletion of soluble epoxide hydrolase suppressed chronic kidney disease-related vascular calcification by restoring Sirtuin 3 expression. *Cell Death Dis.* 2021;12:992.
12. Fornage M, Boerwinkle E, Doris PA, Jacobs D, Liu K, Wong ND. Polymorphism of the soluble epoxide hydrolase is associated with coronary artery calcification in African-American subjects: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Circulation.* 2004;109:335-339.
13. Burdon KP, Lehtinen AB, Langefeld CD, Carr JJ, Rich SS, Freedman BI, Herrington D, Bowden DW. Genetic analysis of the soluble epoxide hydrolase gene, EPHX2, in subclinical cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study. *Diab Vasc Dis Res.* 2008;5:128-134.
14. Purba ER, Leuhery EA, Oguro A, Imaoka S. The metabolism of lysophosphatidic acids by allelic variants of human soluble epoxide hydrolase. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2015;30:75-81.
15. Enayetallah AE, Grant DF. Effects of human soluble epoxide hydrolase polymorphisms on isoprenoid phosphate hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341:254-60.
16. Kramer JS, Woltersdorf S, Duflot T, Hiesinger K, Lillich FF, Knöll F, Wittmann SK, Klingler FM, Brunst S, Chaikuad A, Morisseau C, Hammock BD, Buccellati C, Sala A, Rovati GE, Leuillier M, Fraineau S, Rondeaux J, Hernandez-Olmos V, Heering J, Merk D, Pogoryelov D, Steinhilber D, Knapp S, Bellien J, Proschak E. Discovery of the First in Vivo Active Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase Domain. *J Med Chem.* 2019;62:8443-8460.
17. Hou HH, Hammock BD, Su KH, Morisseau C, Kou YR, Imaoka S, Oguro A, Shyue SK, Zhao JF, Lee TS. N-terminal domain of soluble epoxide hydrolase negatively regulates the VEGF-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res.* 2012;93:120-129.
18. Hou HH, Liao YJ, Hsiao SH, Shyue SK, Lee TS. Role of phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase in regulating simvastatin-activated endothelial nitric oxide synthase. *Sci Rep.* 2015;5:13524.

19. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, Zimmerman GA, Hama K, Aoki J, Arai H, Prestwich GD. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR γ agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:131-136.
20. Lee G, Elwood F, McNally J, Weiszmann J, Lindstrom M, Amaral K, Nakamura M, Miao S, Cao P, Learned RM, Chen JL, Li Y. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem*. 2002;277:19649-19657.
21. Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013;19:254-263.
22. Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, Matsushita K. Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF-signalling. *Cardiovasc Res*. 2008;77:221-230.
23. Alesutan I, Feger M, Tuffaha R, Castor T, Musculus K, Buehling SS, Heine CL, Kuro-O M, Pieske B, Schmidt K, Tomaschitz A, Maerz W, Pilz S, Meinitzer A, Voelkl J, Lang F. Augmentation of phosphate-induced osteo-/chondrogenic transformation of vascular smooth muscle cells by homoarginine. *Cardiovasc Res*. 2016;110:408-418.
24. Schibler D, Russell RG, Fleisch H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin. Sci*. 1968;35:363-372.
25. O'Neill WC, Lomashvili KA, Malluche HH, Faugere MC, Riser BL. Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int*. 2011;79:512-517.
26. Villa-Bellosta R. Vascular Calcification: Key Roles of Phosphate and Pyrophosphate. *Int J Mol Sci*. 2021;22:13536.
27. Woldt E, Terrand J, Mlih M, Matz RL, Bruban V, Coudane F, Foppolo S, El Asmar Z, Chollet ME, Ninio E, Bednarczyk A, Thiersé D, Schaeffer C, Van Dorsselaer A, Boudier C, Wahli W, Chambon P, Metzger D, Herz J, Boucher P. The nuclear hormone receptor PPAR γ counteracts vascular calcification by inhibiting Wnt5a signalling in vascular smooth muscle cells. *Nat Commun*. 2012;3:1077.

28. Reinhold S, Blankesteyn WM, Foulquier S. The Interplay of WNT and PPAR γ Signaling in Vascular Calcification. *Cells*. 2020;9:2658.
29. Wimmer JLE, Kleinermanns K, Martin WF. Pyrophosphate and Irreversibility in Evolution, or why PPi Is Not an Energy Currency and why Nature Chose Triphosphates. *Front Microbiol*. 2021;12:759359.
30. Geraldo LHM, Spohr TCLS, Amaral RFD, Fonseca ACCD, Garcia C, Mendes FA, Freitas C, dosSantos MF, Lima FRS. Role of lysophosphatidic acid and its receptors in health and disease: novel therapeutic strategies. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6:45.

FIGURES

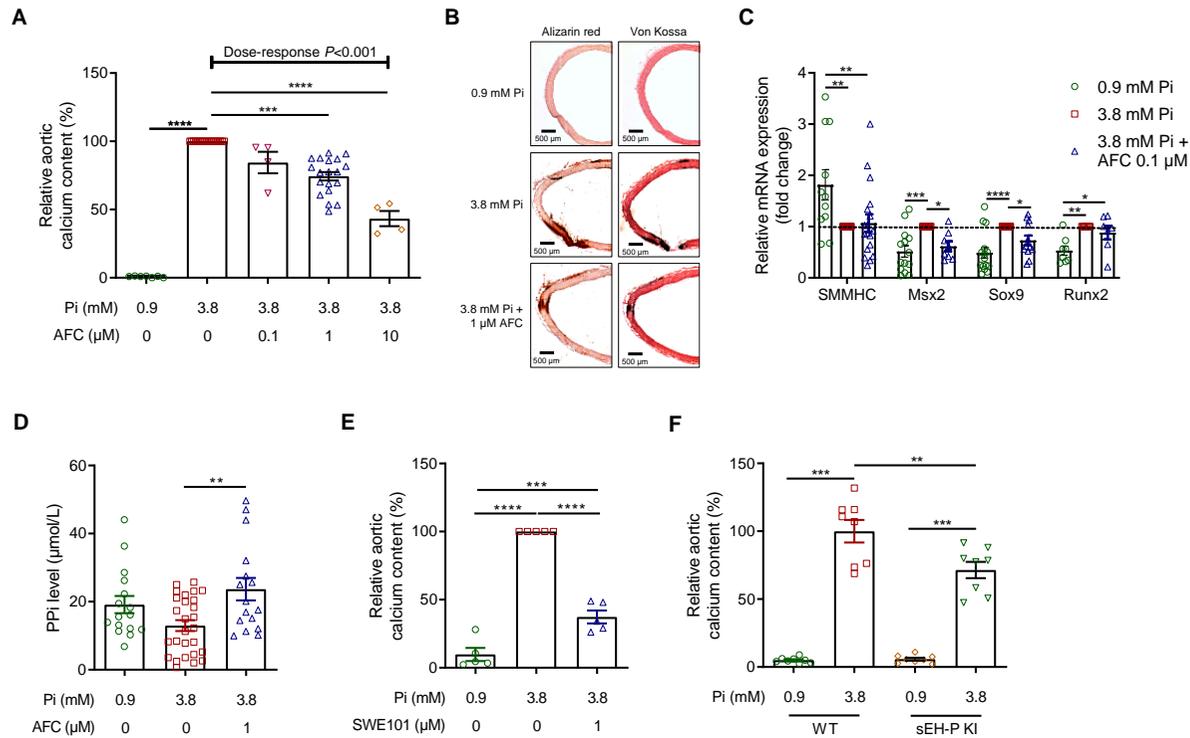


Figure 1. Relative calcium content of aortic rings cultured during 7 days in normal (0.9 mM inorganic phosphate, Pi) and high-phosphate (3.8 mM Pi) conditions, in absence and in presence of increasing concentrations of the sEH-P inhibitor *N*-acetyl-S-farnesyl-L-cysteine (AFC; A), and representative images of Alizarin red and Von Kossa staining (B). Aortic mRNA expression levels of the contractile marker smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) and of the osteochondrogenic markers Msh homeobox 2 (Msx2), sex determining region Y-box 9 (Sox9) and runt-related transcription factor 2 (Runx2) (C) and PPI level (D), relative aortic calcium content (E), and relative aortic calcium content (F).

pyrophosphate anions (PPi) levels in culture supernatants (D) after 7 days of culture in 0.9 and 3.8 mM Pi conditions, in absence and in presence of AFC 1 μ M. Relative aortic calcium content of aortic rings cultured during 7 days in 0.9 and 3.8 mM Pi in absence and in presence of the sEH-P inhibitor SWE101 (E) and of aortic rings isolated from WT and sEH-P KI rats cultured during 7 days in 0.9 and 3.8 mM Pi (F). Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, *** P <0.0001.

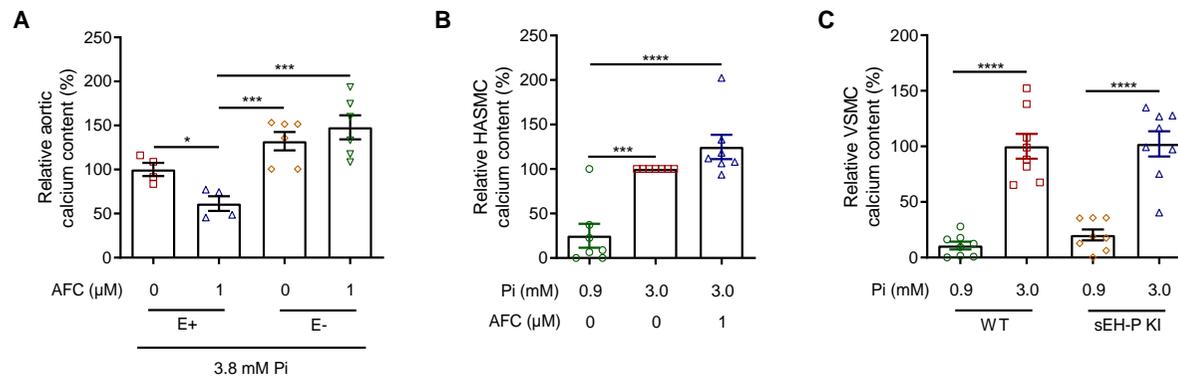


Figure 2. Relative calcium content of intact (E+) and deendothelialized (E-) aortic rings cultured during 7 days in high-phosphate (3.8 mM Pi) conditions, in absence and in presence of the sEH-P inhibitor *N*-acetyl-S-farnesyl-L-cysteine (AFC; A). Relative calcium content of human aortic smooth muscle cells (HASMC) cultured during 14 days in normal (0.9 mM Pi) and high-phosphate (3.0 mM Pi) conditions, in absence and in presence of 1 μM AFC (B) and of aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) isolated from WT and sEH-P KI rats cultured during 14 days in 0.9 and 3.8 mM Pi (C). Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

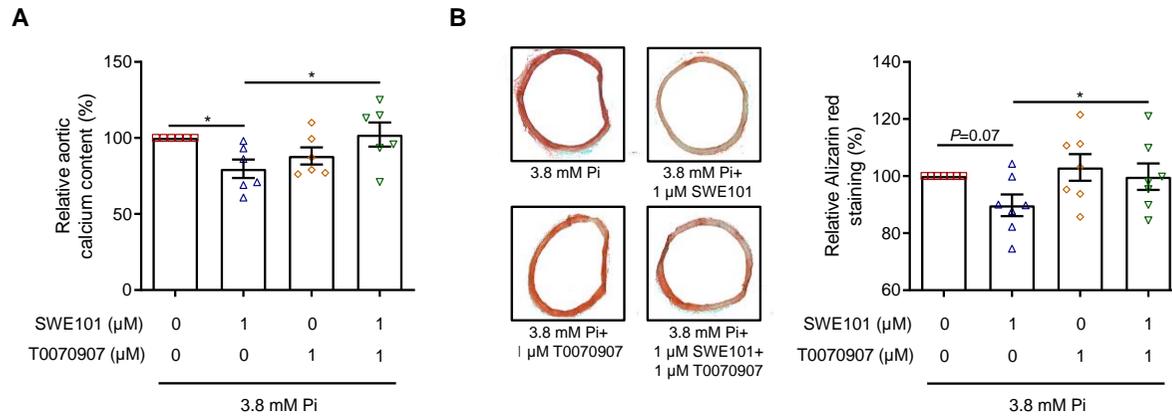


Figure 3. Relative calcium content (A) and Alizarin red staining (B) of aortic rings cultured during 7 days in normal (0.9 mM Pi) and high-phosphate (3.8 mM Pi) conditions. in absence and in presence of the sEH-P inhibitor SWE101, the PPAR γ antagonist T0070907 and their combination. Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

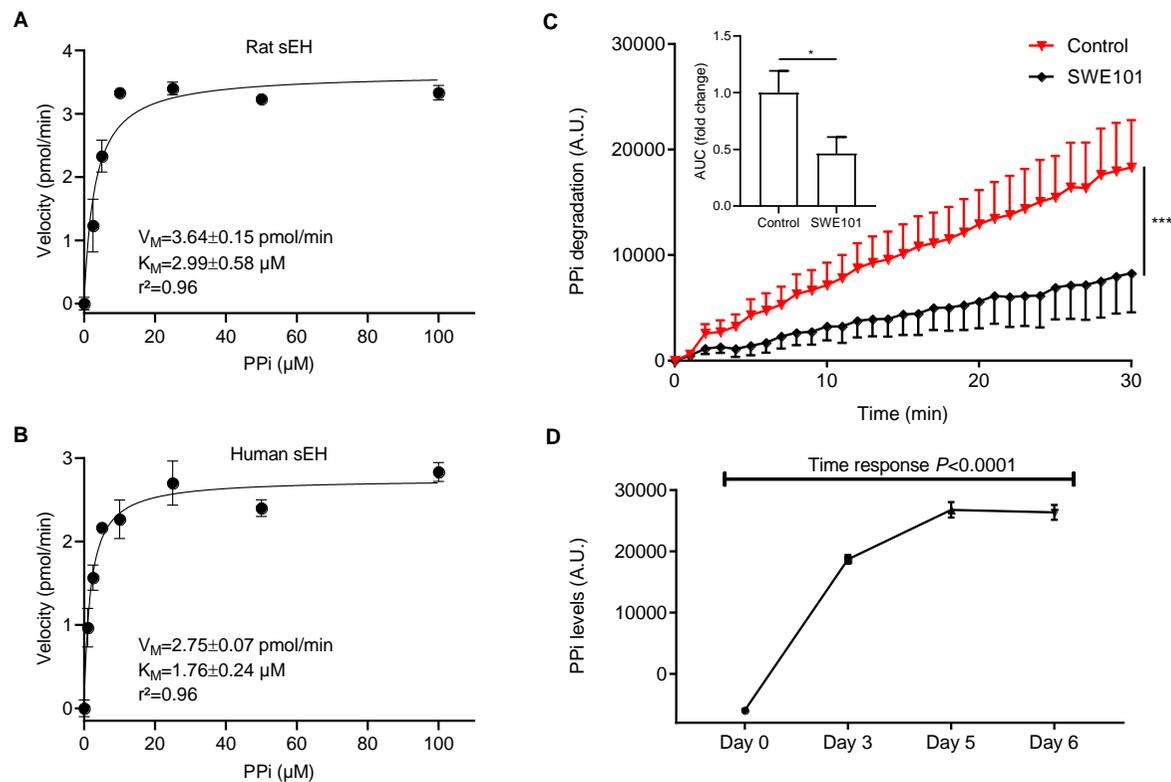


Figure 4. Kinetic analysis of rat (A) and human (B) recombinant sEH towards pyrophosphate anions (PPi; $n=3$). The kinetic constants (K_M and V_M) were calculated by non-linear fitting of the Michaelis equation using the enzyme kinetic module of using GraphPad Prism software 8.0.2. Time course of 10 μM PPi degradation by human recombinant sEH in absence and in presence of the sEH-P inhibitor SWE101 at 1 μM (C). Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way ANOVA or repeated measured ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test. $**P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. PPi levels measured in the

supernatants of human aortic endothelial cells (HAEC) cultured in standard conditions during 0, 3, 5 and 6 days (n=2-4; D). Mean and SEM values are shown and *P* value is from linear-trend *ANOVA*.

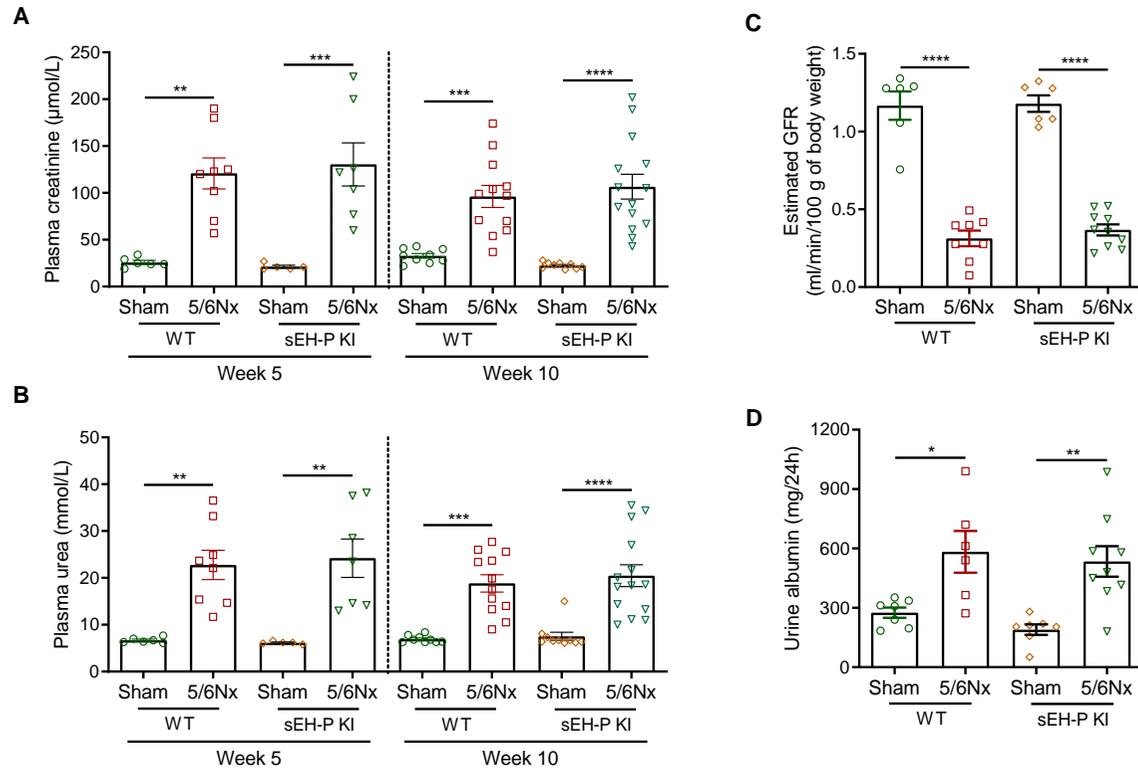


Figure 5. Plasma creatinemia (A), urea nitrogen (B), estimated glomerular filtration rate (GFR, C) and 24h-urinary albumin (D) determined 5 and/or 10 weeks after surgery in WT and sEH-P KI sham-operated and 5/6 nephrectomized rats (5/6Nx). Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

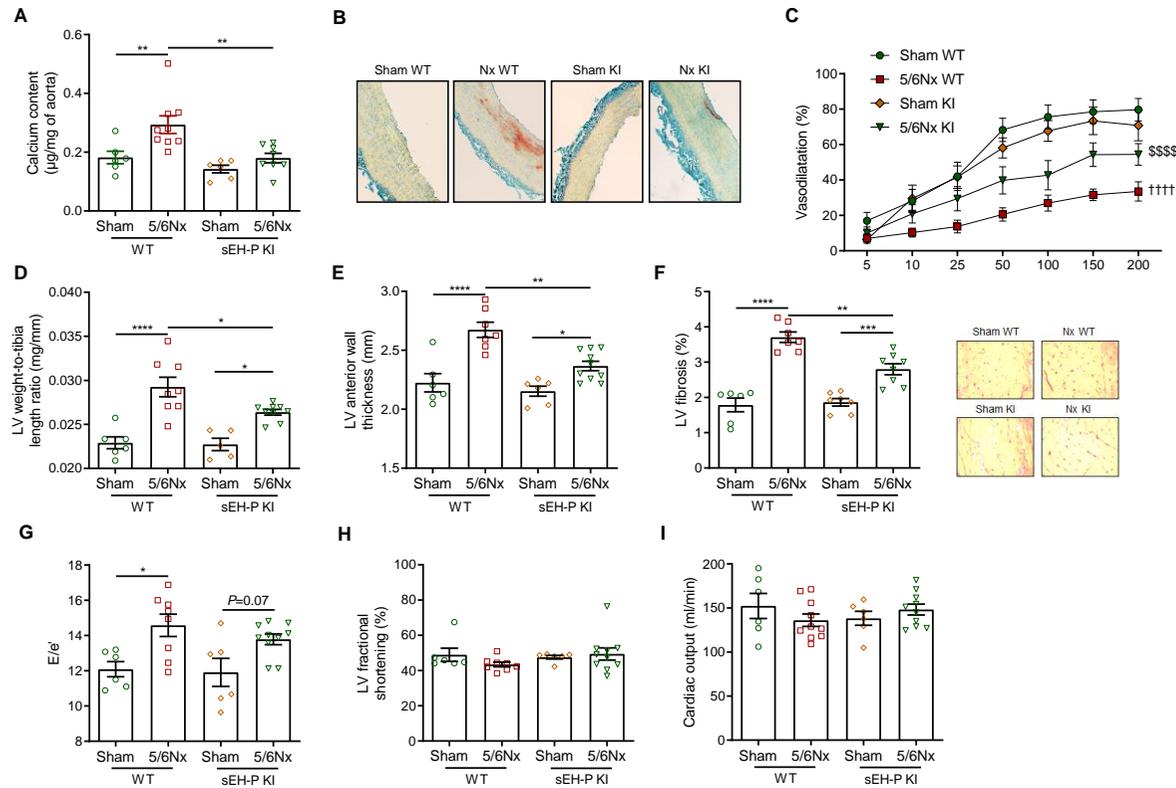
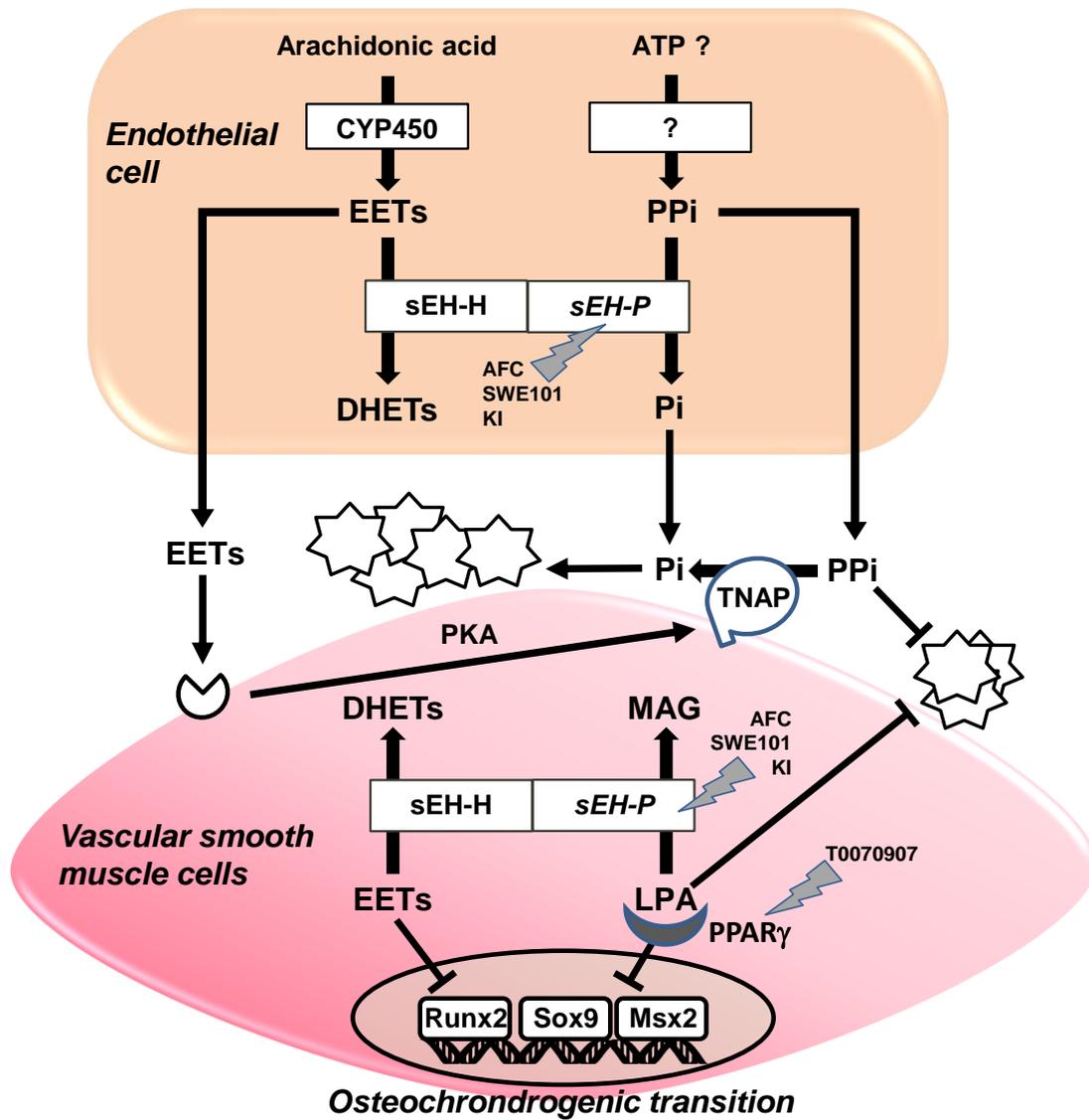


Figure 6. Calcium content and representative Alizarin red staining (A) of aortas, flow-mediated dilatation of second mesenteric resistance artery (B), left ventricular (LV) weight-to-tibia length ratio (C), LV anterior wall thickness (D), LV end-diastolic diameter (E), LV ventricular fibrosis and representative Sirius red staining (F), LV E/e' ratio (G), LV fractional shortening (H) and cardiac output (I) determined in WT and sEH-P KI sham-operated and 5/6 nephrectomized rats (5/6Nx). Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way ANOVA (A, C-F) or repeated measures ANOVA (B) with Bonferroni's *post hoc* test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. +++ $P < 0.0001$ vs. WT sham. \$\$\$\$ $P < 0.0001$ vs. WT 5/6Nx.



Graphical abstract. Schematic representation of the role of the hydrolase and phosphatase domains of soluble epoxide hydrolase (sEH) in vascular calcification.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

In vitro and ex vivo experiments

Pharmacological agents

Inhibition of the phosphatase domain of soluble epoxide hydrolase (sEH-P) was first obtained using *N*-Acetyl-S-farnesyl-L-cysteine (AFC; 63270, Cayman Chemical Company). AFC has a IC₅₀ value against sEH phosphatase of around 0.84±0.9 μM and nonspecific effects *i.e.*, inhibition of methyl transferase enzymes, at a concentration higher than 20 μM.^{1,2} To confirm the results obtained with AFC, complementary experiments were performed with the recently-validated more specific sEH-P inhibitor 4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)butanoic acid (SWE101: 1 μM) that exhibits a a CI₅₀ value of 0.058±0.005 μM.³ The role of NO-synthase and PPAR gamma was assessed using co-treatment of aortic rings with their inhibitors *N*ω-Nitro-L-arginine (L-NNA: 100 μM; Sigma-Aldrich) and T0070907 (1 μM; Tocris Bioscience) respectively.

LC-MS/MS analysis

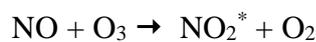
To monitor the impact of AFC on sEH enzymatic activities, 14,15-EET, 14,15-DHET, oleoyl-L-α-lysophosphatidic acid (oleoyl-LPA) and its metabolite 1-oleoyl-*rac*-glycerol (OG) were quantified in the aortic culture supernatant at day 6 by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry as previously described.⁴ 14,15-EET and 14,15-DHET analysis was performed after protein precipitation, lipids extraction and saponification. Briefly, 300 μL of culture supernatant were spiked with 10 μL of internal standards (14,15-EETd₈ and 11,12-DHETd₁₁ at 200 ng/mL) and 1mL of methanol was added for protein precipitation. After centrifugation, the supernatant was collected and lipids were extracted with dichloromethane after acidification with formic acid. The organic layer was evaporate to dryness under a gentle

stream of nitrogen. The crude extract was saponified with sodium hydroxide at +90°C for 20 min to release fatty acids into their free form. Then, the sample was acidified with formic acid and EETs and DHETs were extracted with a second extraction. The sample was once again evaporate to dryness and reconstituted in 100µL of methanol. Chromatographic separation was performed on a Kinetex C18 column (2.6-µm particle size, 50-mm length × 3-mm inner diameter). The autosampler temperature was set at 8 °C, the column oven at 30 °C, the injected volume was 20 µL, and the flow rate was 600 µL/min. The mobile phase was 0.2% formic acid in MeOH (solvent A) and 2 mM ammonium formate with 0.2% formic acid in water (solvent B). The elution was started with 95% B (0-0.5 min), 95-20% B (0.5-1 min), 20-10% B (1-4 min), 10-5% B (4-5 min), 5-95% B (5-6 min), 95% B (6-7.5 min). The following multiple reaction monitoring (MRM) transitions m/z 319.1 to m/z 219.1 and m/z 337.1 to m/z 207.1 in negative ion mode were used to detect 14,15-EET and 14,15-DHET respectively.

For the determination of oleoyl-LPA and OG, 200µL of methanol (MeOH) was added to 100 µL of culture supernatant in a 1.7 mL Eppendorf tube. The sample was thoroughly vortexed for 10 seconds and centrifuged at 16,100 x g for 5 min. Chromatographic separation was achieved on a Kinetex C18 column (2.6-µm particle size, 50-mm length × 3-mm inner diameter). The autosampler temperature was set at 8 °C, the column oven at 30 °C, the injected volume was 20 µL, and the flow rate was 500 µL/min. The mobile phase was 1% acetic acid in MeOH (solvent A) and 10 mM ammonium acetate with 1% acetic acid in water (solvent B). The elution was started with 30% B (0-0.5 min), 30-1% B (0.5-3 min), 1% B (3-9 min), 1-30% B (9-10 min), 30% B (10-12 min). The following MRM transitions m/z 435 to m/z 152.9 in negative ion mode and m/z 357.2 to m/z 265.1 in positive ion mode were used to detect oleoyl-LPA and OG respectively.

Chemiluminescence assay

The concentrations of the NO metabolite nitrite were determined in the culture supernatant of aortic rings at day 6 using a tri-iodide/ozone-based chemiluminescence assay.⁵ Thawed culture supernatant (250 µL) was injected into a glass purge vessel containing acidified tri-iodide solution, at room temperature, and actively purged with nitrogen in-line with a gas-phase chemiluminescence NO analyzer (NO Analyzer 280, Sievers). The tri-iodide solution rapidly reduces NO metabolites, mainly nitrite (>95% in plasma), to NO gas, which is measured by its gas-phase chemiluminescent reaction with ozone:



The excited state of nitrogen dioxide emits light, which is then detected by a photomultiplier tube. Quantification of nitrite in a sample involves the conversion of the NO Analyzer signal into actual concentration using a calibration curve drawn from standard nitrite solutions prepared in phosphate buffer.

Viability assay

Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT; M5655, Sigma-Aldrich), a yellow tetrazole reduced to purple formazan in living cells, was used to determine the viability of aortic rings. The MTT substrate was prepared in a PBS solution at a final concentration of 0.05 mg/mL. Aortic rings were incubated in MTT solution during 1 hour at 37°C and 5% CO₂. The MTT solution was then removed and the aortic rings were left 2 hours at room temperature. DMSO was added to dissolve formazan and changes in absorbance at 570 nm, which is directly proportional to the quantity of viable cells, were measured.

Quantification of calcium deposition

Aortic segments or human VSMC were washed once with PBS and then decalcified with 0.6 N HCl overnight at 4°C. The calcium content in the HCl supernatant was colorimetrically analyzed with the o-cresolphthalein complexone method.⁶ Briefly, a solution of ortho-cresolphthalein complexone at 300 µM (P5631, Sigma-Aldrich) is prepared with 8-hydroxyquinoline 16 mM (252565, Sigma-Aldrich) in 2-amino-2-methyl-1-propanol 0.5M distilled water solution (pH=10.5; Sigma-Aldrich) and heated for 2 hours. For the quantification, 25 µl of HCl supernatants are added to 150 µl of ortho-cresolphthalein solution in 96-well plates. Plates are shaken for 15 min at 500 RPM and the absorbance is then measured at 565 nm. Calcium content in aortic rings were corrected by aortic dry weight with aortas dried overnight at 37°C.

Pyrophosphate (PPi) assays

PPi concentrations in the culture supernatant of aortic rings were determined by the use of a fluorogenic pyrophosphate sensor using the manufacturer instructions (MAK168 Sigma Aldrich).⁶ Briefly, samples were diluted (1/5 assay buffer) and 20 µL were mixed with 20 µL of PPi sensor. Fluorescence was read within 15 min using microplate reader (Flexstation, Molecular Devices; $\lambda_{ex} = 316/\lambda_{em} = 456$ nm). After background signal (no PPi) removal, the concentration was determined from a PPi standard curve (10^{-7} to 10^{-4} M).

PPi assays hSEH and rSEH Christophe

Immortalized human aortic endothelial cells (HAEC; ATCC CRL-4052) were cultured in 12-well plates with endothelial cell growth kit-VEGF (ATCC PCS-100-041) and supplemented by 10 units/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin (P4333, Sigma Aldrich) at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO₂. Culture medium was removed after 3 to 6 days of culture for measurements of PPi levels (PPi kit). Results were normalized to PPi levels measured in culture medium removed from wells without cells.

Histological assessment of the osteochondrogenic differentiation

Samples were cryopreserved in OCT (Optimum Cutting Temperature, O.C.T Compound, Sakura® Finetek). Seven µm-thick cross sections were obtained perpendicularly to the vessels (Leica® CM 1850 Cryostat). Briefly, the slides were stained 2 minutes with Alizarin Red S solution (40 mmol/l, pH=4.2, at room temperature) to observe specifically calcium ions. Slides were then immersed successively in 3 baths (100% acetone, acetone-toluene (1:1) and 100% toluene) to dehydrate them completely. Von Kossa staining (VK) was used to identify divalent ions. The slides were fixed by ethanol with 2 successive baths for 5 minutes. A 1% silver nitrate solution was added in the dark for 30 minutes and slides were then rinsed with water. Sodium thiosulfate (5%) was added for 5 minutes, rinsed in water and Kernechtrot counterstain was added (0.2% Kernechtrot in aqueous solution, 5% aluminium sulfate) for 5 minutes. The slides were washed with water and dehydrated with 100% EtOH and toluene before observations.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using the RNA isolation kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Then 500 ng RNA was reversed transcribed into cDNA using the 'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit' (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Primers for the osteochondrogenic transcription factor genes Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Msh homeobox 2 (Msx2), and sex determining region Y-box 9 (Sox9), the contractile marker smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC), , and GAPDH were from Eurogentec (See Supplementary Table 1). The quantitative PCR was performed on Biorad CFX connect RealTime System using SYBR Green Master Mix and RNA expression levels of the different genes were corrected for GAPDH.

***In vivo* experiments**

Renal Parameters

Water intake and 24-h urine volume were obtained 5 and 10 months after surgery in rats placed in metabolic cages. Plasma creatinine, urea and the calcium-to-phosphorus product were assessed using enzymatic methods 5 and 10 weeks after surgery thanks to 100 μ L-retro-orbital blood collection and aortic blood sampling respectively in rats anesthetized with 1-2% isoflurane. Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate (GFR) was performed 9 weeks after surgery by using fluorescein-isothiocyanate-labelled sinistrin in freely moving rats as previously described.⁷ The remnant kidney of nephrectomized rats and the left kidney of sham-operated rats were removed and weighted at sacrifice. The kidney weight was normalized to tibia length. In addition, Masson's trichrome staining of paraffin-embedded kidney sections was used for semi-quantitative scoring of glomerular, tubular injury, interstitial inflammation and interstitial fibrosis as previously described.⁸

Cardiac parameters

Echocardiography was carried out 9 weeks after surgery under light anesthesia (1–2% isoflurane) using a Vivid 7 ultrasound echograph (GE Healthcare, Buc) equipped with a M12L linear probe operating at 14 MHz and fitted out with Echopac PC software (GE Medical Systems). All echocardiography studies were performed and analyzed by a single operator. Briefly, a two-dimensional parasternal long axis view of the left ventricle was obtained at the level of the papillary muscle, in order to record M-mode tracings. Left-ventricular (LV) end-diastolic (EDD) and systolic diameters (ESD), and end-diastolic anterior LV wall thickness were measured by the American Society of Echocardiology leading-edge method from at least 3 consecutive cardiac cycles. LV fractional shortening (FS) was calculated from the variation in LV diameters as $FS (\%) = ((LVEDD - LVESD) / LVEDD) \times 100$. In addition, LV outflow

velocity was measured by pulsed-wave Doppler, and cardiac output was calculated as $CO = \text{aortic VTI} \times [\pi \times (\text{LV outflow diameter}/2)^2] \times \text{heart rate}$, where VTI is velocity–time integral, as described previously.⁹ Doppler measurements were made at the tip of the mitral leaflets for diastolic filling profiles in the apical four-chamber view, allowing to determine the E/e' ratio (mitral inflow E wave/e' tissue Doppler mitral annulus velocity), as estimate of diastolic function. Rat hearts were removed and dissected. The LV weight was normalized to tibia length. In addition, Sirius red staining of LV cryosections was used for collagen determination.

Vascular parameters

At sacrifice, endothelium-dependent flow-mediated dilatation was assessed on second mesenteric resistance artery segment. Briefly, the mesentery was removed and placed in cold oxygenated Krebs buffer. A 2–3 mm segment of third mesenteric resistance artery segment was isolated and mounted on an arteriograph (DMT, Denmark). Vessels were pre-constricted using 10^{-5} M phenylephrine before assessing the dilatory response to stepwise increase in intraluminal flow (0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 and 200 $\mu\text{L}/\text{min}$). In addition, the thoracic aorta was removed and cut in half. One segment was washed once with PBS and then decalcified with 0.6 N HCl overnight at 4°C. The calcium content in the HCl supernatant was colorimetrically analyzed with the o-cresolphthalein complexone method cresol-phthalein method.⁶ Calcium content in aortic rings were corrected by aortic dry weight with aortas dried overnight at 37°C. In addition, calcium deposition was evaluated on the second thoracic segment using 7 μm -thick histological slices stained with Alizarin red.

References

1. Enayetallah AE, Grant DF. Effects of human soluble epoxide hydrolase polymorphisms on isoprenoid phosphate hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341:254-60.
2. Volker C, Miller RA, McCleary WR, Rao A, Poenie M, Backer JM, Stock JB. Effects of farnesylcysteine analogs on protein carboxyl methylation and signal transduction. *J Biol Chem* 1991;266:21515-22.
3. Kramer JS, Woltersdorf S, Dufлот T, Hiesinger K, Lillich FF, Knöll F, Wittmann SK, Klingler FM, Brunst S, Chaikuad A, Morisseau C, Hammock BD, Buccellati C, Sala A, Rovati GE, Leuillier M, Fraineau S, Rondeaux J, Hernandez-Olmos V, Heering J, Merk D, Pogoryelov D, Steinhilber D, Knapp S, Bellien J, Proschak E. Discovery of the First in Vivo Active Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase Domain. *J Med Chem.* 2019;62:8443-8460.
4. Leuillier
5. Bellien J, Iacob M, Remy-Jouet I, Lucas D, Monteil C, Gutierrez L, Vendeville C, Dreano Y, Mercier A, Thuillez C, Joannides R. Epoxyeicosatrienoic acids contribute with altered NO and endothelin-1 pathways to conduit artery endothelial dysfunction in essential hypertension. *Circulation.* 2012;125:1266-1275.
6. Varennes O, Mentaverri R, Dufлот T, Kauffenstein G, Objois T, Lenglet G, Avondo C, Morisseau C, Brazier M, Kamel S, Six I, Bellien J. The Metabolism of Epoxyeicosatrienoic Acids by Soluble Epoxide Hydrolase Is Protective against the Development of Vascular Calcification. *Int J Mol Sci.* 2020;21:4313.
7. Schock-Kusch D, Sadick M, Henninger N, Kraenzlin B, Claus G, Kloetzer HM, Weiss C, Pill J, Gretz N. Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:2997-3001.
8. Hamzaoui M, Roche C, Coquerel D, Dufлот T, Brunel V, Mulder P, Richard V, Bellien J, Guerrot D. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Prevents Experimental Type 4 Cardiorenal Syndrome. *Front Mol Biosci.* 2021;7:604042.

9. Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Renet S, Lerebours G, Mahlberg-Gaudin F, Thuillez C. Long-term heart rate reduction induced by the selective I_f current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation* 2004;109: 1674–1679.

SUPPLEMENTARY TABLE

Supplementary Table 1. Primers used for quantitative RT-PCR

	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')
GAPDH	TATGATGACATCAAGAAGGTGG	CACCACCCTGTTGCTGTA
Runx2	CCTCTGACTTCTGCCTCTGG	GATGAAATGCCTGGGAAGT
Msx2	CAGAACCGAAGGGCTAAGGCA	GTAGGAGGCGCTGTATATGG
Sox9	GTGCTGAAGGGCTACGACTGG	GCAGATGCGGGTACTGGT
SMMHC	CAGTATTTGGCTGTGGTGGC	CATTGCCGAAAGCCTCCAGG

SUPPLEMENTARY FIGURES

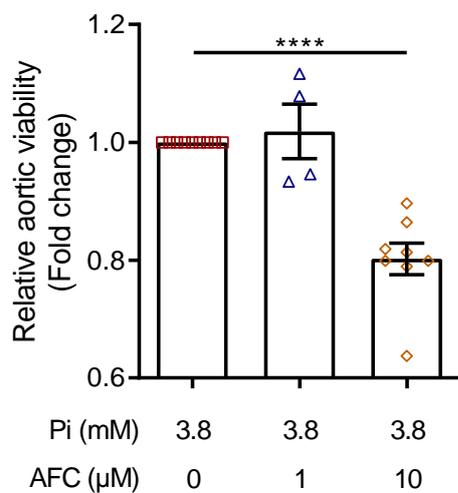


Figure S1. Viability of rat aortic rings cultured during 7 days in high-phosphate conditions (Pi 3.8 mM) in absence and in presence of *N*-acetyl-S-farnesyl-L-cysteine (AFC) at 1 and 10 μM, assessed using a methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium assay. Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test. **** $P < 0.0001$.

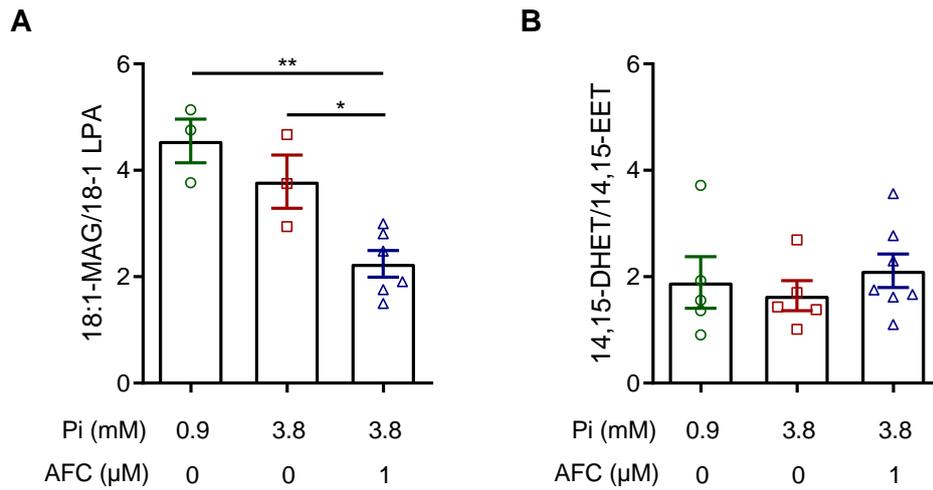


Figure S2. Ratio of 18:1 lysophosphatidic acid-to-18:1 monoacylglycerol (18:1 MAG/18:1 LPA; A) and of 14,15-epoxyeicosatrienoic acid-to-14,15-dihydroxyeicosatrienoic acid (14,15-EET-to-14,15-DHET; B) in the supernatants of aortic rings cultured during 7 days in normal (0.9 mM inorganic phosphate, Pi) and high-phosphate (3.8 mM Pi) conditions, in absence and in presence of 1 μM *N*-acetyl-*S*-farnesyl-*L*-cysteine (AFC). Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way *ANOVA* with Bonferroni's *post hoc* test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

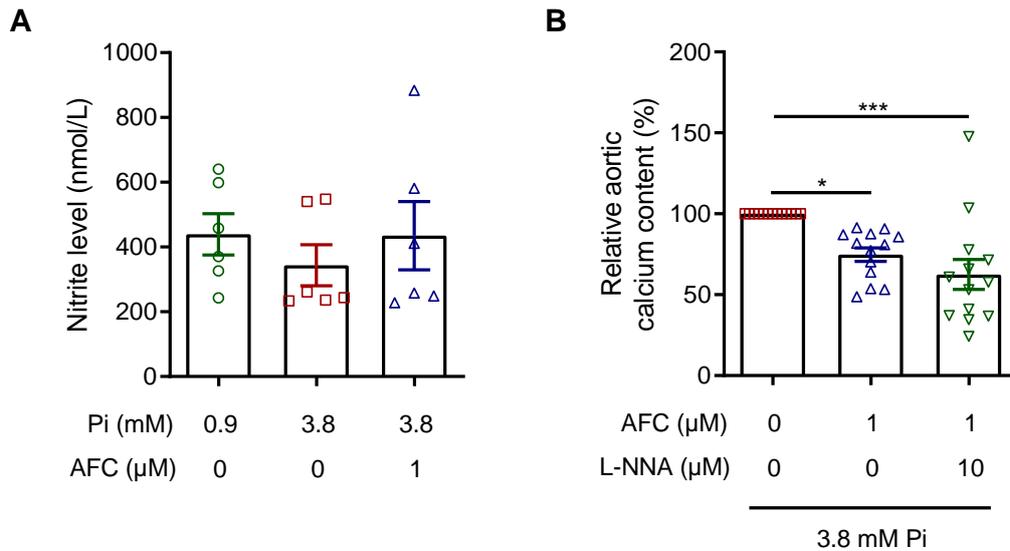


Figure S3. Nitrite levels in the supernatants of aortic rings cultured during 7 days in normal (0.9 mM inorganic phosphate, Pi) and high-phosphate (3.8 mM Pi) conditions, in absence and in presence of 1 μ M *N*-acetyl-*S*-farnesyl-L-cysteine (AFC). Relative calcium content of aortic rings cultured in 3.8 mM Pi during 7 days, in absence and in presence of 1 μ M AFC alone and associated with the NO-synthase inhibitor L-NA at 10 μ M. Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way *ANOVA* with Bonferroni's *post hoc* test. * P <0.05; *** P <0.001.

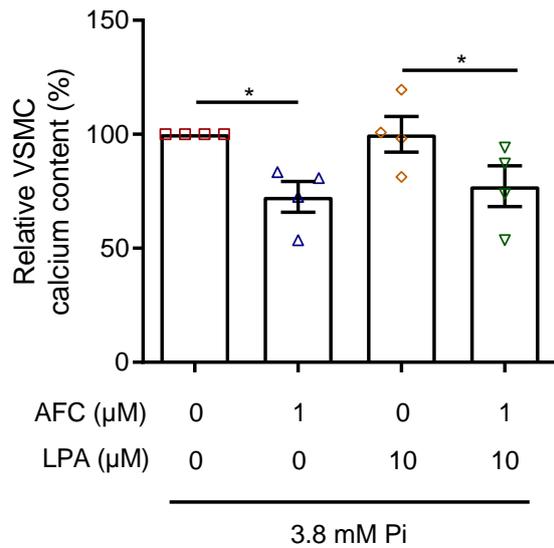


Figure S4. Relative calcium content of aortic rings cultured during 7 days in high-phosphate (3.8 mM Pi) conditions, in absence and in presence of 1 μM *N*-acetyl-S-farnesyl-L-cysteine (AFC), 10 μM lysophosphatid acids (LPA) and their combination. Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way *ANOVA* with Bonferroni's *post hoc* test. * $P < 0.05$.

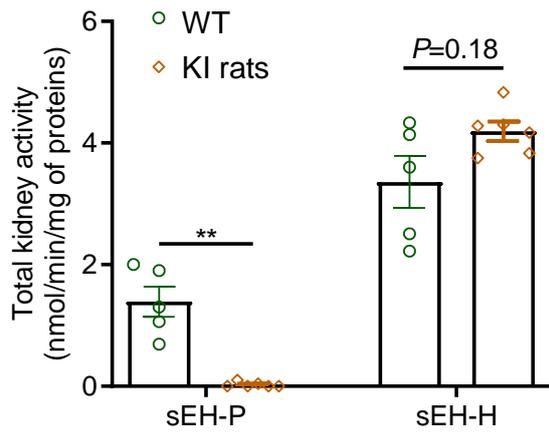


Figure S5. Soluble epoxide hydrolase (sEH-H) and phosphatase (sEH-P) activities measured in renal tissue of WT and sEH-P KI rats. Mean and SEM values are shown and group effect was determined by Mann-Whitney test. ** $P < 0.01$.

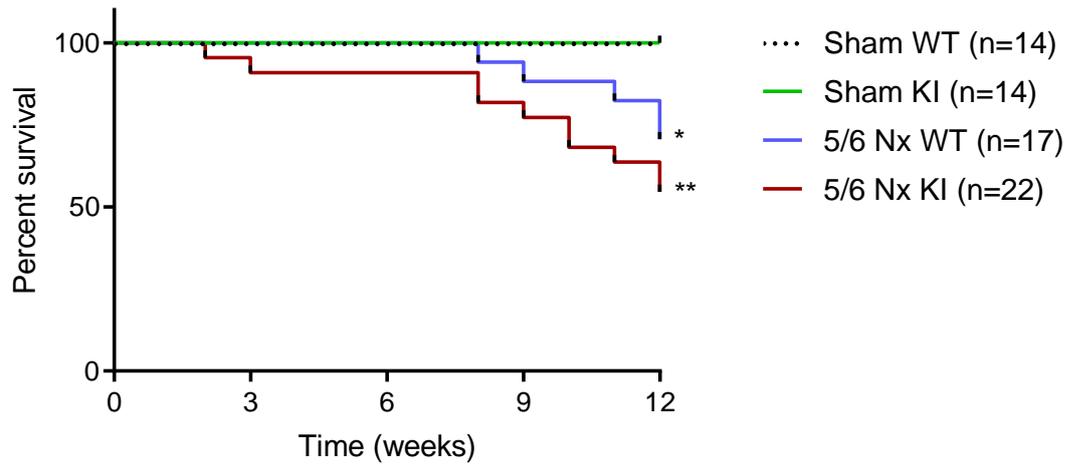


Figure S6. Twelve-week survival after surgery of WT and sEH-P KI sham-operated and 5/6 nephrectomized rats (5/6Nx). Group effect was determined by log-rank test (Mantel-Cox).

* $P < 0.05$ vs. Sham WT, ** $P < 0.01$ vs. Sham KI.

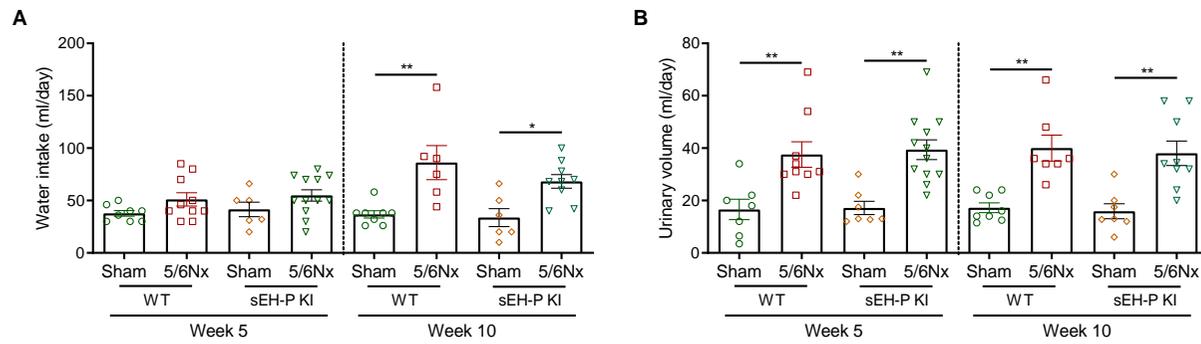


Figure S7. Urine volume (A) and water intake (F) measured 5 and 10 weeks after surgery in WT and sEH-P KI sham-operated and 5/6 nephrectomized rats (5/6Nx). Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

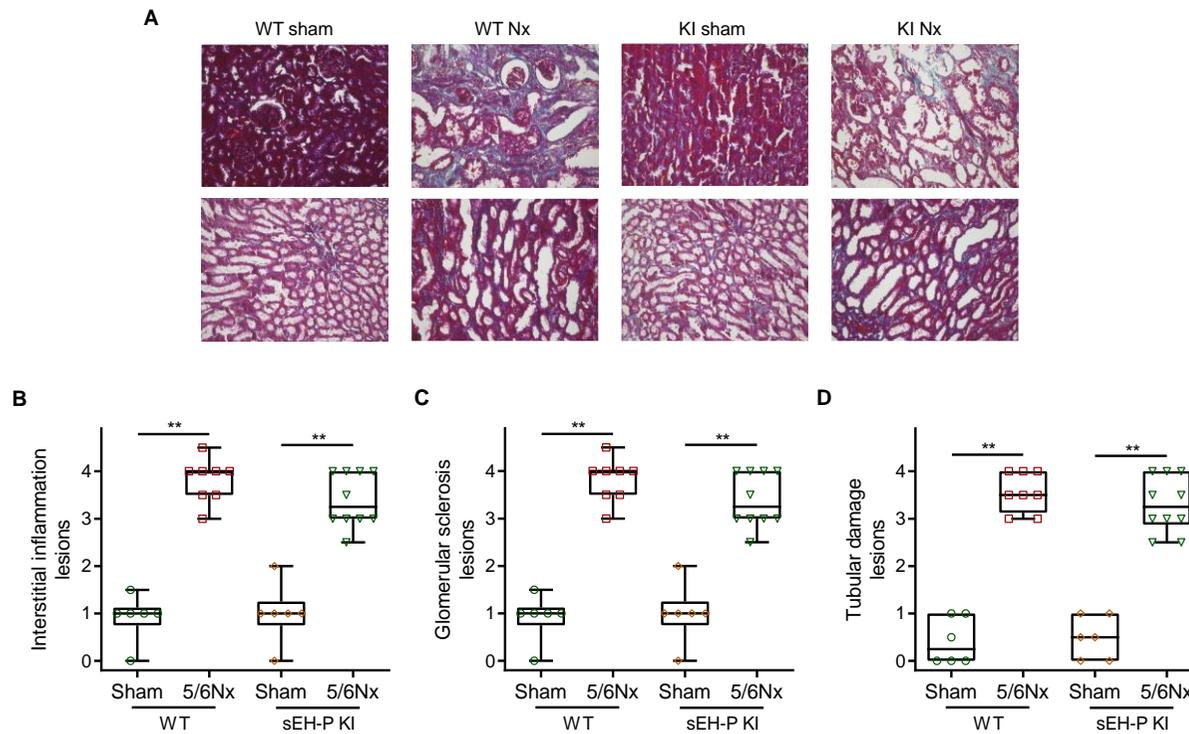


Figure S8. Representative images of kidney Trichrome Masson staining (A) and scoring of interstitial inflammation (B), tubular damage (C) and glomerular sclerosis (D) lesions in WT and sEH-P KI sham-operated and 5/6 nephrectomized rats (5/6Nx). Mean and SEM values are shown and group effect was determined by Kruskal-Wallis test with Dunn's *post hoc* test. ** $P < 0.01$.

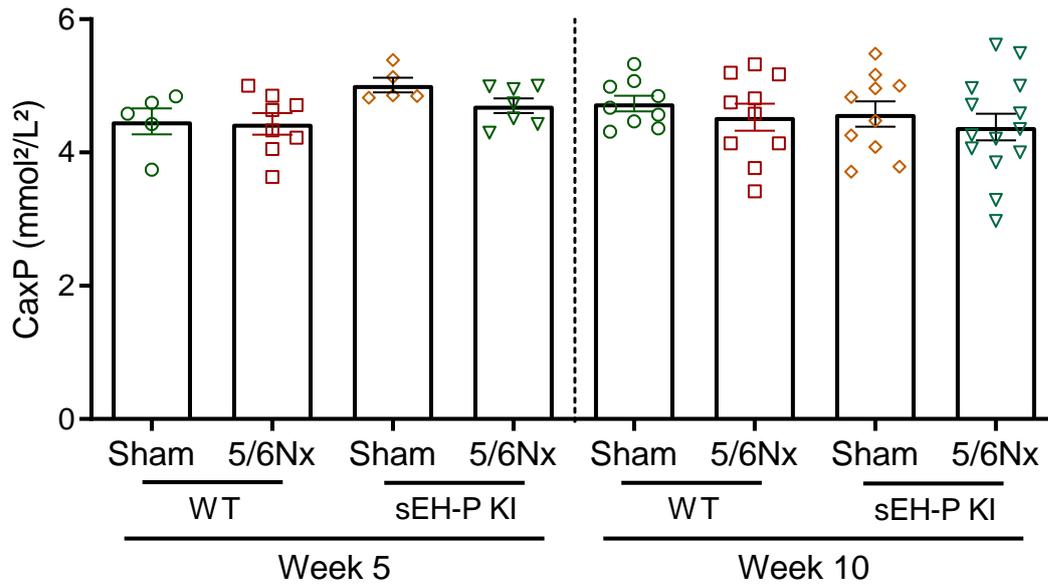


Figure S9. Plasma calcium-to-phosphore product measured 5 and 10 weeks after surgery in WT and sEH-P KI sham-operated and 5/6 nephrectomized rats (5/6Nx). Mean and SEM values are shown and group effect was determined by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test.

Étude 2

Modèle animal du rétrécissement aortique calcifié (RAC)



Article

Subtotal Nephrectomy Associated with a High-Phosphate Diet in Rats Mimics the Development of Calcified Aortic Valve Disease Associated with Chronic Renal Failure

Hind Messaoudi ¹, Thomas Levesque ^{1,2}, Nicolas Perzo ¹, Elodie Berg ^{1,3}, Guillaume Feugray ^{1,4}, Anaïs Dumesnil ¹, Valéry Brunel ⁴, Dominique Guerrot ^{1,5}, Hélène Eltchaninoff ^{1,2}, Vincent Richard ^{1,6}, Saïd Kamel ^{7,8}, Eric Durand ^{1,2}, Youssef Bennis ^{1,7,9} and Jérémy Bellien ^{1,6,*}



Citation: Messaoudi, H.; Levesque, T.; Perzo, N.; Berg, E.; Feugray, G.; Dumesnil, A.; Brunel, V.; Guerrot, D.; Eltchaninoff, H.; Richard, V.; et al. Subtotal Nephrectomy Associated with a High-Phosphate Diet in Rats Mimics the Development of Calcified Aortic Valve Disease Associated with Chronic Renal Failure. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 1539. <https://doi.org/10.3390/jcm12041539>

Academic Editor: Rihab Bouchareb

Received: 26 December 2022

Revised: 6 February 2023

Accepted: 13 February 2023

Published: 15 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ INSERM EnVI UMR 1096, University of Rouen Normandie, F-76000 Rouen, France

² Department of Cardiology, CHU Rouen, F-76000 Rouen, France
³ Department of Thoracic Surgery, CHU Rouen, F-76000 Rouen, France
⁴ Department of General Biochemistry, CHU Rouen, F-76000 Rouen, France
⁵ Department of Nephrology, CHU Rouen, F-76000 Rouen, France
⁶ Department of Pharmacology, CHU Rouen, F-76000 Rouen, France
⁷ UR UPJV 7517, Mécanismes Physiopathologiques et Conséquences des Calcifications Cardiovasculaires (MP3CV), Centre de Recherche Universitaire en Santé, Université de Picardie Jules Verne, F-80054 Amiens, France
⁸ Department of Biochemistry, Amiens-Picardie University Hospital, F-80054 Amiens, France
⁹ Department of Pharmacology, Amiens-Picardie University Hospital, F-80054 Amiens, France *

Correspondence: jeremy.bellien@chu-rouen.fr; Tel.: +33-(0)2-35-14-83-68

Abstract: Introduction. This study addressed the hypothesis that subtotal nephrectomy associated with a high-phosphorus diet (5/6Nx + P) in rats represents a suitable animal model to mimic the cardiovascular consequences of chronic kidney disease (CKD) including calcified aortic valve disease (CAVD). Indeed, the latter contributes to the high morbidity and mortality of CKD patients and sorely lacks preclinical models for pathophysiological and pharmacological studies. **Methods.** Renal and cardiovascular function and structure were compared between sham-operated and 5/6 Nx rats + P 10 to 12 weeks after surgery. **Results.** As expected, 11 weeks after surgery, 5/6Nx + P rats developed CKD as demonstrated by their increase in plasma creatinine and urea nitrogen and decrease in glomerular filtration rate, estimated by using fluorescein-isothiocyanate-labelled sinistrin, anemia, polyuria, and polydipsia compared to sham-operated animals on a normal-phosphorus diet. At the vascular level, 5/6Nx + P rats had an increase in the calcium content of the aorta; a decrease in mesenteric artery dilatation in response to a stepwise increase in flow, illustrating the vascular dysfunction; and an increase in blood pressure. Moreover, immunohistology showed a marked deposition of hydroxyapatite crystals in the aortic valve of 5/6Nx + P rats. Echocardiography demonstrated that this was associated with a decrease in aortic valve cusp separation and an increase in aortic valve mean pressure gradient and in peak aortic valve velocity. Left-ventricular diastolic and systolic dysfunction as well as fibrosis were also present in 5/6Nx + P rats. **Conclusion.** This study demonstrates that 5/6Nx + P recapitulates the cardiovascular consequences observed in humans with CKD. In particular, the initiation of CAVD was shown, highlighting the interest of this animal model to study

1. Introduction

Despite major therapeutic advances, cardiovascular morbidity and mortality remain high in patients with chronic kidney disease (CKD) mainly due to the deleterious effects

the mechanisms involved in the development of aortic stenosis and test new therapeutic strategies at an early stage of the disease.

Keywords: animal model; chronic kidney disease; cardiovascular complications; calcified aortic valve disease

of uremic toxins on the cardiovascular system [1,2]. Among their effects, the potentiation of the development of ectopic calcification in arteries but mostly in cardiac valves remain poorly studied due in particular to the lack of representative animal models [2–4]. Calcified aortic valve disease (CAVD) is a slow and progressive disorder that ranges from mild valve thickening without obstruction of blood flow, termed aortic sclerosis, to severe calcification with impaired leaflet motion that characterize aortic stenosis. CAVD is highly prevalent and aortic stenosis progresses more rapidly in CKD patients than in the general population, contributing to increase cardiac afterload that further aggravates cardiac remodeling and dysfunction and significantly reduces survival [3,4]. To date, the mechanisms involved in the development of CAVD are poorly understood, and no specific therapeutic strategies are available. This is notably due to the absence of adequate animal models that truly mimic human AS [5,6]. Recently, it was proposed that the induction of CKD using subtotal nephrectomy associated with a high-phosphorus diet (5/6Nx + P) can promote aortic valve calcification, but the associated modifications in cardiovascular structure and function have to be evaluated [7].

In this context, the aim of the present study was to perform a comprehensive cardiovascular phenotyping of 5/6Nx + P rats with particular emphasis on the development of CAVD.

2. Methods

2.1. Animals and Experimental Procedures

All procedures were performed in accordance with the standards and ethical rules (CENOMEXA #24107). Twenty-four 10-week-old male Sprague–Dawley rats were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and were aged until 18 weeks old, weighing 500–600 g. Then, 16 rats were submitted to a two-step surgical procedure performed by a single trained experienced operator (H.M.) in order to ensure reproducibility. The first step of the surgical procedure consisted of ligation of the upper branch of the left kidney artery, followed by a cauterization of the lower pole of the left kidney, leading to 2/3 of a non-functioning left kidney. One week later, the right kidney was removed, inducing 5/6 Nx. Then, 5/6 Nx rats were fed ad libitum a normal-calcium, high-phosphate diet (pellets containing 1% total calcium, 1.8% total phosphorus, Safe, Augy, France) until animal sacrifice 11 weeks after surgery. A group of 8 sham-operated rats (surgical laparotomy) eating a standard normal-calcium, normal-phosphate diet (pellets containing 1% total calcium, 0.9% total phosphorus, Safe) served as controls.

2.2. Blood and Renal Evaluations

At sacrifice, plasma blood samples were collected to assay creatinine, urea nitrogen, sodium, potassium, calcium, and phosphorus on Cobas® analyzer (Roche, Mannheim Germany), as well as white and red blood cell counts, hemoglobin, and hematocrit levels. Uremic toxins including indoxyl sulfate, paracresyl sulfate, indole-acetic acid, trimethylamine oxide, and hippuric acid were assayed in the serum using a liquid chromatography– tandem mass spectrometry method as previously described [8]. Next, 24 h urine was collected 8 weeks after surgery using metabolic cages, allowing for the quantification of sodium, potassium, calcium, and phosphorus excretion, as well as albuminuria and creatininuria using the Catalyst Analyzer (IDEXX, Westbrook, ME, USA). Transcutaneous determination of glomerular filtration rate was performed 8 weeks after surgery by using fluorescein-isothiocyanate-labelled sinistrin as previously described [9].

2.3. Vascular Evaluations

Non-invasive measurements of systolic blood pressure were performed by tail cuff plethysmography (CODA, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA) 10 weeks after surgery. These measurements were performed in conscious and trained mice and consisted of two series of 10 cycles of measurements for each animal. At sacrifice, endotheliumdependent flow-mediated dilation was assessed on the second mesenteric-resistance artery segment. Briefly, the mesentery was removed and placed in cold oxygenated Krebs buffer. A 2–3 mm segment of third mesenteric resistance artery segment was isolated and mounted on an arteriograph (DMT, Aarhus, Denmark). Vessels were pre-constricted using 10^{-5} M phenylephrine before assessing the dilatory response to stepwise increase in intraluminal flow (0, 5, 10, 25, 50, 100, and 150 μ L/min). Endothelium-independent dilatation to sodium nitroprusside (10^{-5} M) was assessed in precontracted vessels. In addition, the thoracic aorta was removed and cut in half. One segment was washed once with PBS and then decalcified with 0.6 N HCl overnight at 4 ° C. The calcium content in the HCl supernatant was colorimetrically analyzed by the o-cresolphthalein complexone method [10]. Calcium content in aortic rings were corrected by aortic dry weight with aortas dried overnight at 37 ° C. In addition, calcium deposition was evaluated on the second thoracic segment using 7 μ m thick histological slices stained with Alizarin red [11].

2.4. Cardiac Evaluations

For transthoracic echocardiography, rats were anesthetized with isoflurane 2% in 21% oxygen/compressed air at 1 L/min) and placed on a heated plate to maintain body temperature at 37.5 ° C, the chest shaved, and a Vivid 7 ultrasound echograph (GE Healthcare, Buc, France) equipped with a M12L linear probe operating at 14 MHz and fitted out with Echopac PC software (GE Medical Systems) was used [10].

2.4.1. Left-Ventricular Systolic Function

Briefly, a two-dimensional parasternal long-axis view of the left ventricle was obtained at the level of the papillary muscle, in order to record M-mode tracings. Left-ventricular

(LV) end-diastolic (EDD) and systolic diameters (ESD) and end-diastolic anterior and posterior LV wall thicknesses were measured by the American Society of Echocardiology leading-edge method from at least 3 consecutive cardiac cycles. LV fractional shortening (FS) was calculated from the variation in LV diameters as $FS (\%) = ((LVEDD - LVESD)/LVEDD) \times 100$, and the LV ejection fraction (EF) was calculated by the Teicholz formula from LV diameters. Cardiac output (CO) was calculated by multiplying the stroke volume (the LV end-diastolic volume minus LV end-systolic volume) by the heart rate.

2.4.2. Left-Ventricular Diastolic Function

Doppler measurements were made at the tip of the mitral leaflets for diastolic filling profiles in the apical four-chamber view, allowing us to determine the E/e' ratio (mitral inflow E wave/e' tissue Doppler mitral annulus velocity) as an estimate of diastolic function.

2.4.3. Aortic Valve Assessment

In addition, the aortic valve peak flow velocity and aortic valve mean gradient were measured in the apical five-chamber view by continuous wave doppler in systole. The presence or absence of aortic regurgitation was visualized in this five-cavity view by color Doppler. Furthermore, aortic stenosis was estimated in two-dimensional parasternal long-axis view by measuring the aortic valve cusp separation in systole.

At sacrifice, the heart was harvested and weighed, and a section of the left ventricle was snap-frozen for subsequent determination of LV fibrosis, using 8 μ m thick histological slices stained with Sirius Red as previously described [12]. In addition, the aortic valve was carefully dissected and incubated over 24 h at 4 °C in a solution of a 20 nM Osteosense 680Ex[®] (Perkin-Elmer, Waltham, MS, USA) in PBS. This fluorescent probe binds to hydroxyapatite with high affinity and thus allows for the detection of microcalcifications. Then, the valve was rinsed and snap-frozen for subsequent analysis using 8 μ m thick histological slices with mounting medium containing DAPI. Pictures were acquired on an epifluorescence microscope (Axio Imager 1, Zeiss, Jena, Germany) equipped with an apotome using the Cyanine 5.5 filter for calcification detection and a DAPI filter for cell nuclei detection.

2.5. Statistics

All data are presented as mean \pm SEM unless differentially indicated. Data normality was verified in sham-operated and 5/6Nx + P groups using the Shapiro–Wilk test. Comparisons between groups were performed using Student's t-test for normally distributed data and using

the Wilcoxon rank-sum test for non-normally distributed data. The comparison between groups for endothelium-dependent relaxations to stepwise increase in flow was performed using repeated measures ANOVA.

3. Results

The mortality rate was 25% in the 5/6Nx + P group during the 11-week follow-up, while no death was observed in the sham-operated group (shown in Figure 1a). First of all, 5/6Nx + P rats developed renal failure, as shown by the increase in plasma urea and creatinine and the reduction of glomerular filtration rate compared to sham-operated rats (shown in Figure 1b–d). In addition, 5/6Nx + P rats had polyuria and polydipsia (shown in Figure 1e,f). Biochemical and hematological analyses are shown in Table 1. As expected from the experimental diet, phosphaturia was dramatically increased in 5/6Nx + P rats. Urinary calcium, sodium, and potassium levels were also all increased in 5/6Nx + P rats. However, the plasma levels of calcium and phosphorus as well as the calcium-phosphorus product remained similar between groups. In addition, the plasma sodium level was unchanged, but hyperkalemia was observed in 5/6Nx + P rats as well as hypoproteinemia. Furthermore, anemia developed in 5/6Nx + P rats as shown by the decrease in the number of blood erythrocytes and in hemoglobin and hematocrit levels without change in leukocyte number. As shown in Table 2, the concentrations of uremic toxins were also increased in the serum of 5/6Nx + P rats compared to sham-operated rats.

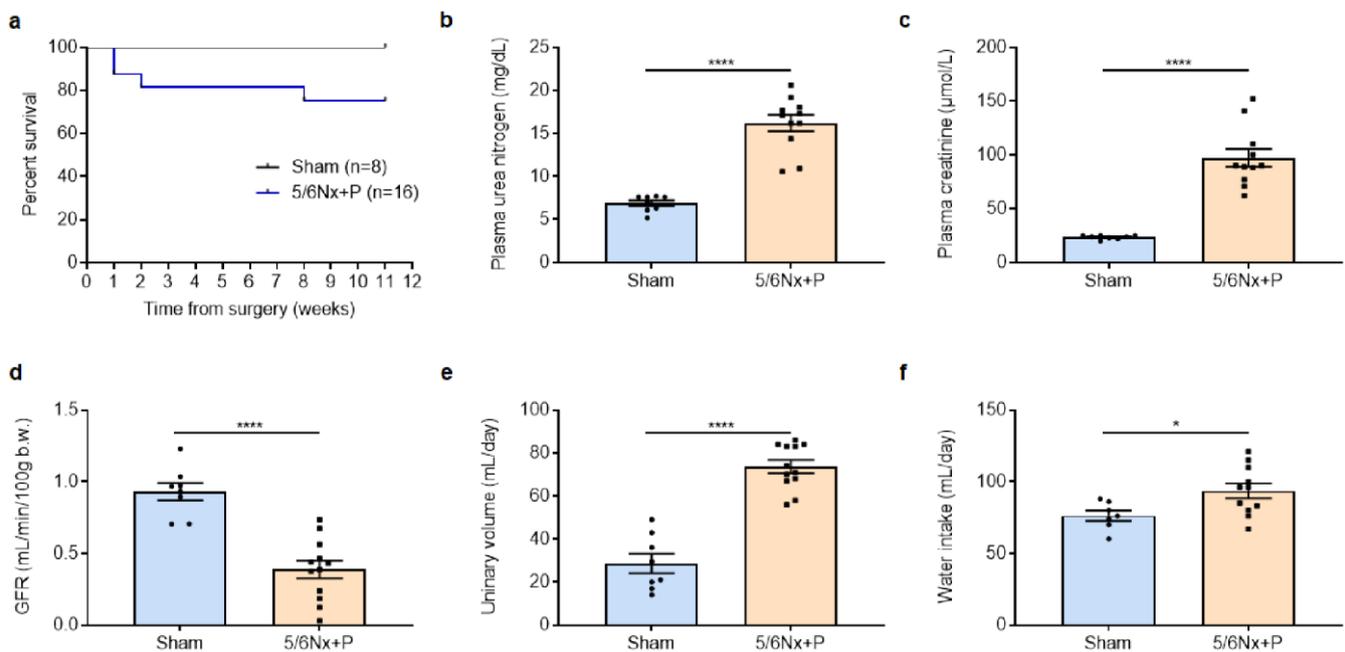


Figure 1. Eleven-week survival after surgery (a), plasma creatinemia (b), urea nitrogen (c), glomerular filtration rate (GFR, d), urinary volume (e), and water intake (f) measured 10 to 11 weeks after surgery in sham-operated and 5/6 nephrectomized rats receiving a high-phosphate diet (5/6Nx + P). * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

At the vascular level, 5/6Nx + P rats displayed aortic calcification, as shown by the increase in aortic calcium content and Alizarin red staining compared to sham-operated rats (Figure 2a,b). This was associated with the presence of systemic hypertension as well as vascular dysfunction, as shown by the impairment of both mesenteric artery endothelium-dependent and -independent dilatation (shown in Figure 2c–e).

Table 1. Hematological and biochemical analyses, 9 to 11 weeks after surgery, in sham-operated rats and 5/6 nephrectomized rats receiving a high-phosphate diet (5/6Nx + P).

Parameters	Sham n = 8	5/6Nx + P n = 11 or 12
Blood hematological parameters (at 11 weeks post-surgery)		
Leukocytes, × 10 ⁹ /L	6.51 ± 0.46	5.78 ± 0.53
Erythrocytes, × 10 ¹² /L	9.2 ± 0.19	6.09 ± 0.41
Hematocrit, %	0.49 ± 0.01	0.35 ± 0.02
Hemoglobin, g/dL	14.99 ± 0.32	10.63 ± 0.69
Plasma biochemical parameters (at 11 weeks post-surgery)		
Sodium, mmol/L	142.3 ± 0.7	142.5 ± 1.1
Potassium, mmol/L	3.87 ± 0.28	4.49 ± 0.12
Calcium, mmol/L	2.42 ± 0.07	2.25 ± 0.09
Phosphorus, mmol/L	1.72 ± 0.08	2.06 ± 0.29
Calcium-phosphorus product	4.15 ± 0.18	4.41 ± 0.44
Proteins, g/dL	5.53 ± 0.09	5.32 ± 0.05
24 h urine biochemical parameters (at 9 weeks post-surgery)		
Creatinine, mmol/L	7.05 ± 0.83	2.53 ± 0.18
Sodium-to-creatinine ratio	7.4 ± 0.34	25.6 ± 1.27
Potassium-to-creatinine ratio	30.4 ± 0.6	60.5 ± 1.9
Calcium-to-creatinine ratio	0.11 ± 0.01	0.30 ± 0.03
Phosphorus-to-creatinine ratio	0.45 ± 0.14	30.71 ± 1.18
Albumin-to-creatinine ratio, mg/mmol	275 ± 26	583 ± 105

Data are mean ± SEM.

Table 2. Serum concentration of uremic toxins assayed 11 weeks after surgery in sham-operated rats and 5/6 nephrectomized rats receiving a high-phosphate diet (5/6Nx + P).

	Sham n = 8	5/6Nx + P p-Value n = 12	
Indoxyl sulfate (mg/L)	0.23 ± 0.05	10.73 ± 1.98	0.0004
Paracresyl sulfate (mg/L)	0.04 ± 0.01	8.23 ± 1.19	<0.0001
Indole acetic acid (mg/L)	0.18 ± 0.02	0.45 ± 0.05	0.0002
Triethylamine oxide (mg/L)	0.11 ± 0.02	1.65 ± 0.33	0.016
Hippuric acid (mg/L)	2.11 ± 0.16	8.23 ± 1.19	0.0006

Data are mean ± SEM.

Of major importance, immunohistological examination of aortic valve sections allowed us to demonstrate the presence of hydroxyapatite crystals in 5/6Nx + P rats but not in shamoperated rats (shown in Figure 3a). In addition, there was an increased CD68+ cells in aortic valves of 5/6Nx + P rats (shown in Figure 3b), demonstrating macrophage infiltration and inflammation. Echocardiography showed classical structural and hemodynamical changes associated with aortic valve calcification, i.e., a decrease in aortic valve cusp separation and an increase in aortic valve peak flow velocity and aortic valve mean pressure gradient (shown in Figure 3c–e). In addition, alterations in cardiac systolic and diastolic function were observed with a slight but significant decrease in LV fractional shortening, ejection fraction, and cardiac output, and an increase in the E/e' ratio (shown in Figure 4a–d), while cardiac remodeling was supported from the nonsignificant increase in LV weight and the presence of LV fibrosis (shown in Figure 4e,f).

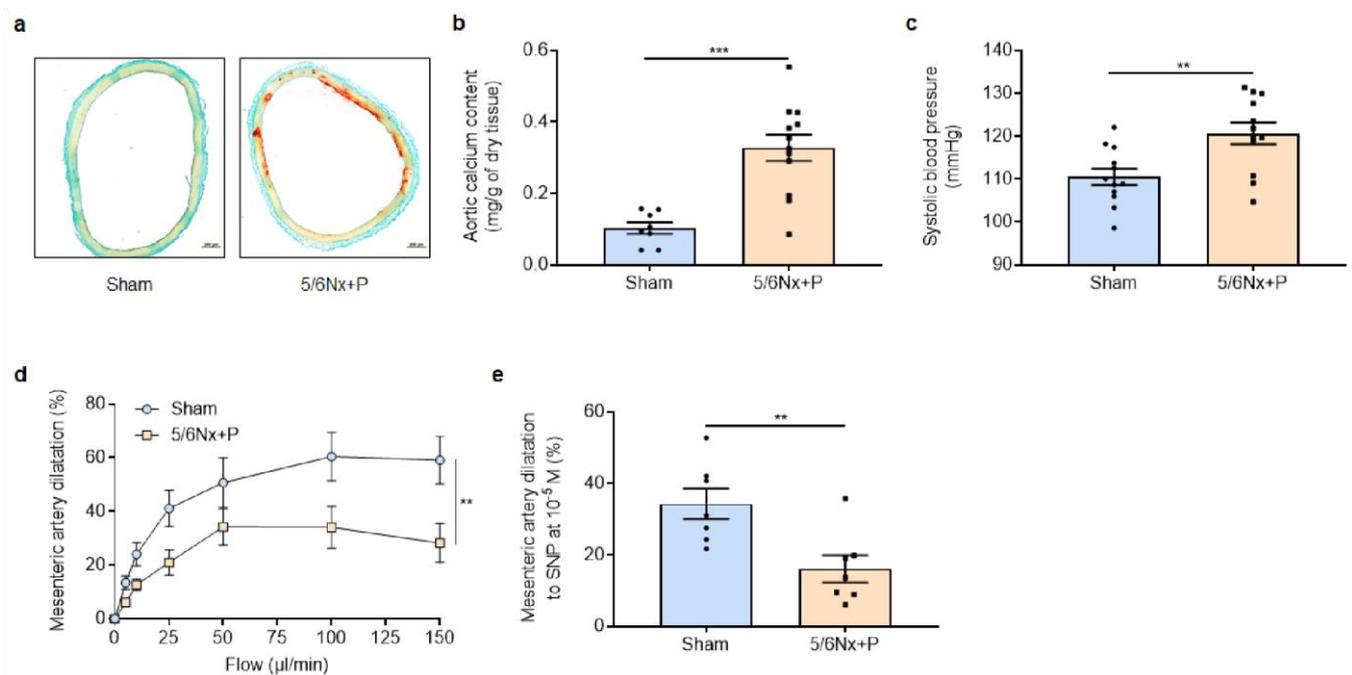
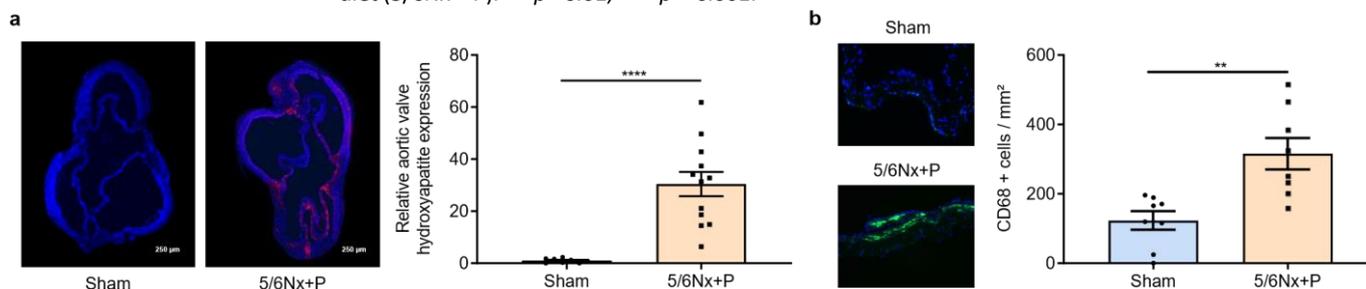


Figure 2. Representative images (a) and relative values of calcium content (b) of aortic rings stained with Alizarin red, systolic blood pressure (c), mesenteric artery endothelium-dependent dilatation to stepwise increase in flow (d), and endothelium-independent dilatation to 10⁻⁵ M sodium nitroprusside (e) obtained 10 to 11 weeks after surgery in sham-operated and 5/6 nephrectomized rats receiving a high-phosphate diet (5/6Nx + P). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



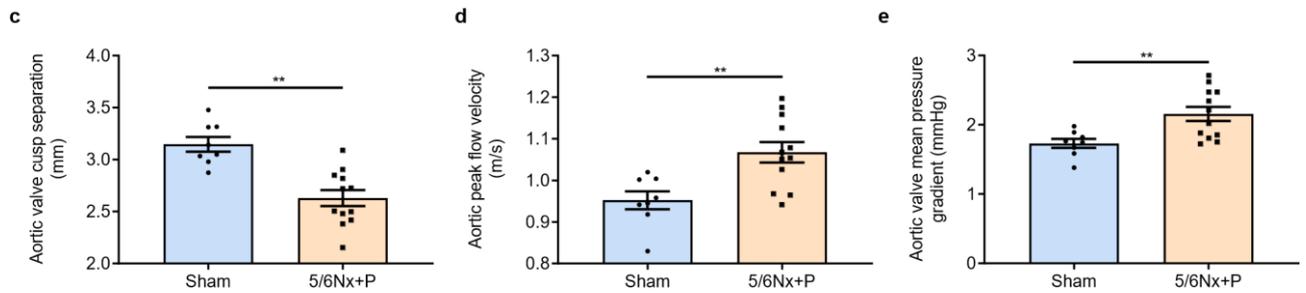


Figure 3. Representative images and relative values of hydroxyapatite expression of aortic valves stained with Osteosense 680Ex[®] (a), representative images and values of CD68+ cells per mm² (green and blue staining represent CD68+ cell and DAPI nuclear marker, respectively) (b), aortic valve cusp separation (c), peak flow velocity (d), and mean pressure gradient (e) obtained 10 to 11 weeks after surgery in sham-operated and 5/6 nephrectomized rats receiving a high-phosphate diet (5/6Nx + P). ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

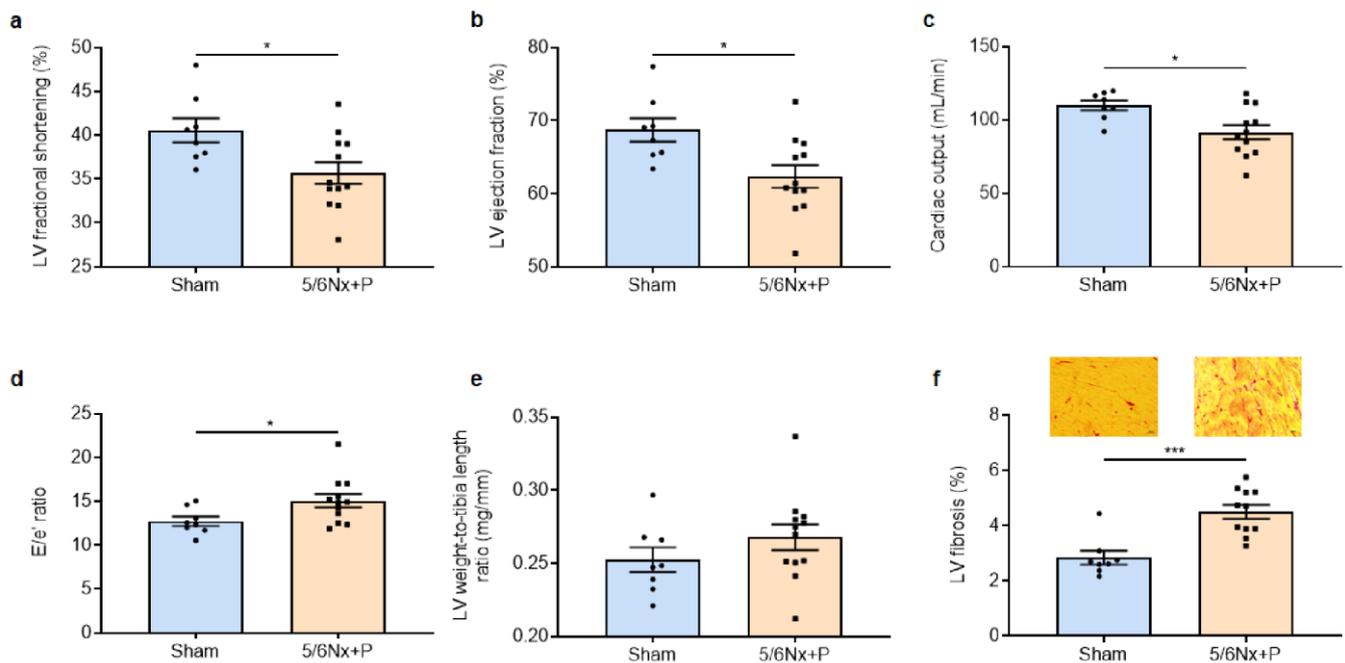


Figure 4. Left-ventricular (LV) fractional shortening (a), ejection fraction (b), cardiac output (c), E/e' ratio (mitral inflow E wave/e' tissue Doppler mitral annulus velocity) (d), LV weight-to-tibia length ratio (e), and representative images of Sirius red-stained LV sections and level of fibrosis (f) obtained 10 to 11 weeks after surgery in sham-operated and 5/6 nephrectomized rats receiving a high-phosphate diet (5/6Nx + P). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4. Discussion

The major finding of this study is that the induction of CKD by subtotal nephrectomy in rats combined with a high-phosphate diet allowed us to promote the development of aortic valvular calcification with classical structural and hemodynamical repercussions of CAVD.

At this time, no reliable animal model for human CAVD exists, restraining the determination of the mechanisms involved in the development of aortic stenosis and the discovery of adequate therapeutic strategies. Only swine has been shown to spontaneously

develop CAVD, while rabbit or murine models require genetic and/or external interventions, are time-consuming, and only a small proportion of the animals truly develop CAVD [5,6]. For this study, we decided to focus on a rat model of subtotal nephrectomy associated with a high-phosphate diet, since CKD remains a major risk factor for the development of aortic stenosis [3,4], and because one recent work demonstrates that it is associated with the development of valvular calcification [7]. We chose a phosphate diet containing 1.8% phosphorus that allowed for maintaining all other dietary nutrients at the same values than the normal 1% phosphate diet and a duration of 10 to 11 weeks since a 8-week period appeared to not be sufficient [7].

As expected from this model, 5/6Nx + P rats quickly developed all the hallmarks of CKD with decreased kidney function, a uremic state, and anemia. In this context, and despite the absence of change in the plasma calcium-phosphorus product, 5/6Nx + P rats displayed ectopic calcification at the arterial level and in the aortic valve. The latter calcifications were highlighted thanks to the use of a synthetic fluorescent bisphosphonate, which binds to hydroxyapatite crystals with high affinity [12], thus allowing us to confirm previous results obtained using sophisticated methods based on electron microscopy and X-ray diffraction [7].

As suggested in CKD patients, vascular calcification may contribute to the development of hypertension and vascular dysfunction in 5/6Nx + P rats. Importantly, we can demonstrate for the first time using echocardiography that the aortic valvular calcification and inflammation is associated with a significant decrease in the aortic valve cusp separation and an increase in aortic valve peak flow velocity and aortic valve mean pressure gradient, which are classically used to categorize patients with CAVD. Although it is not possible to distinguish between the effects of renal dysfunction/uremic toxins and a putative early consequence of CAVD, cardiac diastolic and systolic functions were slightly altered, and cardiac remodeling was already present in 5/6Nx + P rats. The alteration in systolic function was not previously observed in this model by Wang et al. [7], but it should be kept in mind that we used older animals (18-week-old vs. 8-week-old rats) and that the severity of 5/6Nx and thus of kidney damage may vary notably depending on the extent of kidney cauterization. In our 5/6Nx + P rats, the left-ventricular remodeling (as shown by the increase in left ventricle weight and fibrosis) and both the systolic and diastolic dysfunctions of the left ventricle (as shown by the decrease in fractional shortening and the increase in the E/e' ratio, respectively) were consistent with type 4 cardiorenal syndrome [13]. This uremic cardiopathy was associated with an increase in afterload objectified in vivo by the slight but significant increase in arterial blood pressure and ex vivo by the impaired endothelial function. This led to the reduction in cardiac performance (as shown by the decrease in ejection fraction and cardiac output) that will aggravate until heart failure development.

This study demonstrates that subtotal nephrectomy combined with a high-phosphorus diet in SD rats allows us to recapitulate, over a short period, the cardiovascular hallmarks of CKD including CAVD and its hemodynamic consequences. A longer follow-up of the 5/6Nx rats on this high-phosphorus diet may be helpful to potentialize the development of aortic stenosis and cardiac alterations. However, this model already represents a promising experimental tool to study the pathophysiology of CAVD and test the impact of new therapeutic strategies targeting the valvular calcification process at an early stage, in the expected way of finally reversing the course of the disease, improving patients' health, and limiting the need for aortic valve replacement.

Author Contributions: H.M., T.L., N.P., E.B., G.F., A.D., V.B., D.G., Y.B., and J.B. acquired and analyzed the data. V.B., H.E., V.R., S.K., E.D., Y.B., and J.B. designed and supervised the project. Y.B. and J.B. drafted the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the French Government, managed by the National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'avenir" with the reference ANR-16-RHUS-0003 and by a grant from the GCS G4 (FHU CARNAVAL).

Institutional Review Board Statement: This work has been carried out in accordance with the UE Directive 2010/63/EU. The study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines. The protocol was approved by an Institutional Animal Care Committee (CENOMEXA C2EA-54) and the French Ministry of Education and Research (Protocol ID: APAFIS#24107).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: H.E.: V.R., S.K., Y.B., and J.B. are members of the university hospital consortium FHU CARNAVAL (Cardiac Research Network on Aortic Valve and heart failure).

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

References

1. Jankowski, J.; Floege, J.; Fliser, D.; Böhm, M.; Marx, N. Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease: Pathophysiological Insights and Therapeutic Options. *Circulation* **2021**, *143*, 1157–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lim, Y.J.; Sidor, N.A.; Tonial, N.C.; Che, A.; Urquhart, B.L. Uremic Toxins in the Progression of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Toxins* **2021**, *13*, 142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Marwick, T.H.; Amann, K.; Bangalore, S.; Cavalcante, J.L.; Charytan, D.M.; Craig, J.C.; Gill, J.S.; Hlatky, M.A.; Jardine, A.G.; Landmesser, U.; et al. Chronic kidney disease and valvular heart disease: Conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* **2019**, *96*, 836–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Shroff, G.; Bangalore, S.; Bhave, N.; Chang, T.; Garcia, S.; Mathew, R.; Rangaswami, J.; Ternacle, J.; Thourani, V.; Pibarot, P. American Heart Association Council on the Kidney in Cardiovascular Disease and Stroke Council. Evaluation and Management of Aortic Stenosis in Chronic Kidney Disease: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation* **2021**, *143*, e1088–e1114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Miller, J.D.; Weiss, R.M.; Heistad, D.D. Calcific aortic valve stenosis: Methods, models, and mechanisms. *Circ. Res.* **2011**, *108*, 1392–1412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Colleville, B.; Perzo, N.; Avinée, G.; Dumesnil, A.; Ziegler, F.; Billoir, P.; Eltchaninoff, H.; Richard, V.; Durand, E. Impact of high-fat diet and vitamin D3 supplementation on aortic stenosis establishment in waved-2 epidermal growth factor receptor mutant mice. *J. Integr. Med.* **2019**, *17*, 107–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Wang, L.; Tang, R.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Chen, S.; Song, K.; Guo, Y.; Zhang, L.; Wang, X.; Wang, X.; et al. A Rat Model with Multivalve Calcification Induced by Subtotal Nephrectomy and High-Phosphorus Diet. *Kidney Dis.* **2020**, *6*, 346–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. André, C.; Bennis, Y.; Titeca-Beauport, D.; Caillard, P.; Cluet, Y.; Kamel, S.; Choukroun, G.; Maizel, J.; Liabeuf, S.; Bodeau, S. Two rapid, accurate liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the quantification of seven uremic toxins: An application for describing their accumulation kinetic profile in a context of acute kidney injury. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2020**, *1152*, 122234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Schock-Kusch, D.; Sadick, M.; Henninger, N.; Kraenzlin, B.; Claus, G.; Kloetzer, H.M.; Weiss, C.; Pill, J.; Gretz, N. Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats. *Nephrol. Dial. Transpl.* **2009**, *24*, 2997–3001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Merabet, N.; Bellien, J.; Glevarec, E.; Nicol, L.; Lucas, D.; Remy-Jouet, I.; Bounoure, F.; Dreano, Y.; Wecker, D.; Thuillez, C.; et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition improves myocardial perfusion and function in experimental heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2012**, *52*, 660–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Varennes, O.; Mentaverri, R.; Dufлот, T.; Kauffenstein, G.; Objois, T.; Lenglet, G.; Avondo, C.; Morisseau, C.; Brazier, M.; Kamel, S.; et al. The Metabolism of Epoxyeicosatrienoic Acids by Soluble Epoxide Hydrolase Is Protective against the Development of Vascular Calcification. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Mary, A.; Objois, T.; Brazier, M.; Bennis, Y.; Boudot, C.; Lenglet, G.; Paccou, J.; Bugnicourt, J.M.; Choukroun, G.; Drueke, T.B.; et al. Decreased monocyte calcium sensing receptor expression in patients with chronic kidney disease is associated with impaired monocyte ability to reduce vascular calcification. *Kidney Int.* **2021**, *99*, 1382–1391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Di Lullo, L.; Gorini, A.; Russo, D.; Santoboni, A.; Ronco, C. Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease Patients: From Pathophysiology to Treatment. *Cardiorenal. Med.* **2015**, *5*, 254–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Étude 3

Effet de l'inhibition de l'activité de la sEH-P sur le développement des calcifications de la valve aortique et de la sténose aortique

Le RAC est la valvulopathie la plus fréquente dans les pays industrialisés en raison du vieillissement de la population et de l'élévation de la prévalence des facteurs de risque cardiovasculaire. Le RAC représente un enjeu majeur de santé publique pour lequel il n'existe aucun traitement pharmacologique aujourd'hui pour prévenir ou freiner la progression de cette pathologie. L'objectif de cette étude a été d'évaluer les effets de l'inhibition de l'activité sEH-P sur le développement de la calcification valvulaire aortique.

Dans un premier temps, nous avons étudié *in vitro* l'impact de l'inhibition pharmacologique de la sEH-P sur la calcification de VICs humaines (hVICs) isolées de patients ayant bénéficié d'un remplacement valvulaire chirurgical. De plus, des valves aortiques issues de rats de fond génétique Sprague-Dawley sauvages et KI- pour la sEH-P ont été mises en culture dans des conditions procalcifiantes afin de déterminer l'impact de l'inhibition de l'activité de la sEH-P dans ce contexte.

Afin de confirmer d'étudier les effets de l'inhibition de l'activité sEH-P *in vivo* sur la calcification valvulaire aortique, le modèle de néphrectomie subtotale associée à un régime riche en phosphate précédemment décrit a été utilisé (5/6Nx + P).

1. Expression du gène de la sEH dans les hVICs

Des PCR quantitatives ont été réalisées afin de déterminer l'expression du gène de la sEH dans les hVICs issues de valves contrôles (n=3), prélevées chez des patients opérés pour des chirurgies majeures de l'aorte, et calcifiées (n=5). L'analyse des résultats a montré une augmentation significative de l'expression de la sEH dans les hVICs des valves calcifiées (figure 26).

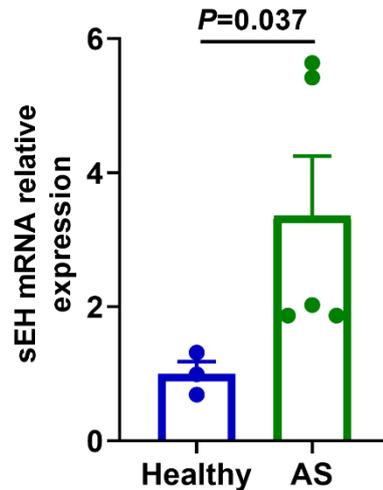


Figure 26: Niveau d'expression génique de la sEH dans les hVICs

Niveau d'expression de la sEH (EPHX2) dans les hVICs issues de valves contrôles ou calcifiées. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un rapport de l'ARNm sur le gène de ménage HPRT1. Moyenne±écart-type ; n_{Contrôles} = 3 ; n_{Sténosées} = 5.

2. Quantification du calcium dans les hVICs issues de valves calcifiées : impact de l'inhibition pharmacologique de la sEH-P

La calcification des hVICs a été quantifiée par dosage colorimétrique au o-crésolphthaléine. Le calcium a été dosé dans des cultures primaires de hVICs incubées en présence de phosphate inorganique (Pi : 2 mM) utilisé pour induire la calcification. Le Pi entraîne une augmentation significative du contenu calcique des hVICs et cette augmentation est partiellement prévenue par l'inhibiteur de l'activité de la sEH-P, le SWE101 (figure 27).

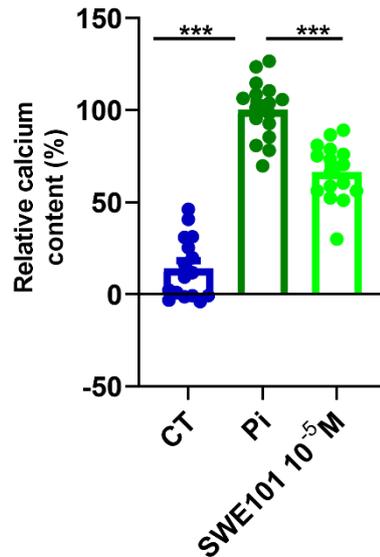


Figure 27 : Quantification de la concentration en calcium dans les hVICs

Quantité de calcium dans les hVICs après 10 jours de culture en l'absence (contrôle : CT) et en présence de Pi à 2 mM associée ou non à du SWE101 (10^{-5} M). Moyenne \pm écart-type ; $n=14$; *** $P < 0,001$.

3. Quantification du calcium dans les valves de rats : impact de l'inhibition génétique de la sEH-P

De la même façon, la calcification a été induite *ex vivo* par la culture de valves de rats sauvages et KI pour la sEH-P en présence de Pi à 3.8 mM. La présence de dépôts calciques, en particulier de cristaux d'hydroxyapatite, a été confirmée par l'utilisation d'une sonde fluorescente (Osteosense). Le Pi entraîne une élévation significative de la calcification dans les valves issues des rats sauvage et l'abolition de l'activité de la sEH-P a permis de prévenir partiellement celle-ci (figure 28)

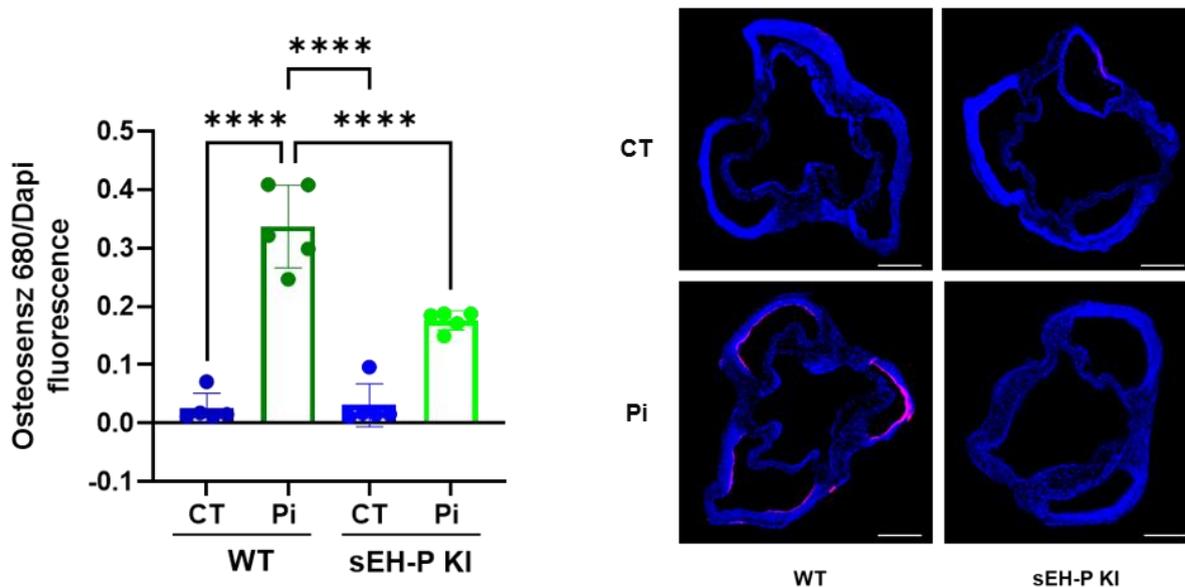


Figure 28 : Quantification de la concentration en calcium *ex vivo* dans des valves murines

Dépôts calciques dans les valves issues de rats sauvages (Wilt-type : WT) et KI pour la sEH-P après 7 jours de culture en l'absence et en présence de phosphate inorganique (Pi : 3.8 mM). Moyenne±écart-type ; $n_{WT} = 5$; $n_{sEH-P-KI} = 5$; * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.

4. Modèle *in vivo* de calcification de la valve aortique : impact de l'inhibition génétique de l'activité de la sEH-P

4.1. Poids corporel et mortalité

Nous avons observé lors du suivi de 11 semaines une baisse significative du poids corporel des animaux chez les animaux 5/6Nx + P comparativement aux animaux contrôles. Ce déclin de la masse corporelle était plus important chez les animaux invalidés pour la sEH-P (figure 29A). Le taux de mortalité était de 25 % dans les groupes 5/6Nx + P sans différence entre les fonds génétiques (figure 29B) .

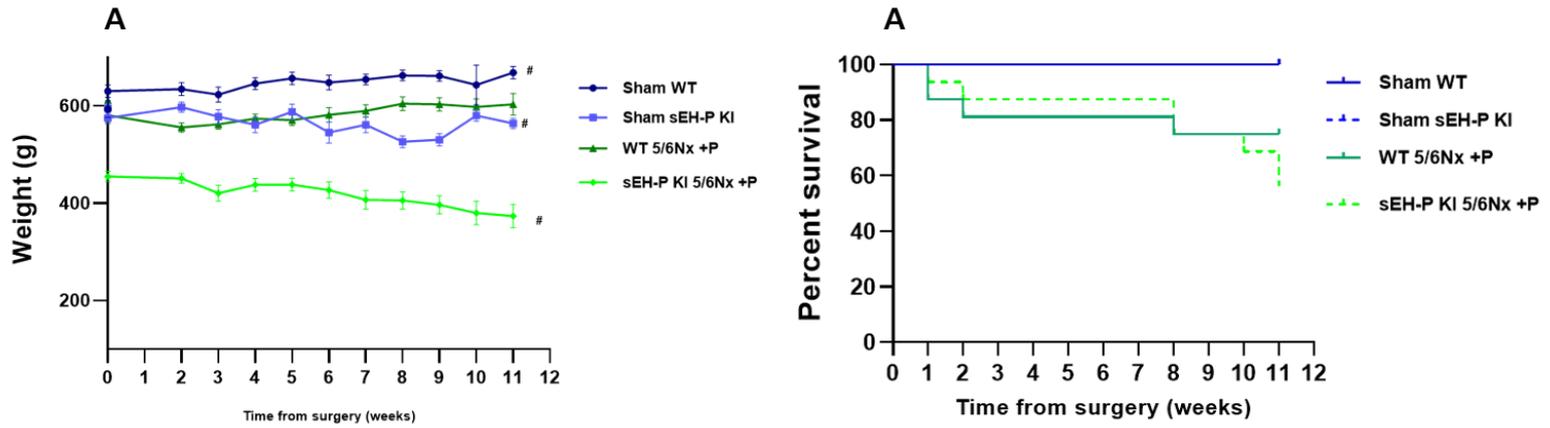


Figure 29 : Suivi du poids corporel et de la survie

Suivi de 11 semaines de la masse (A) et de la mortalité (B) chez des rats sauvages (WT) et KI pour la sEH-P ayant subi une opération fantôme (sham) ou une néphrectomie subtotale associée à un régime riche en phosphate (5/6Nx+P). Moyenne±écart-type ; # p<0.001 sham WT.

4.2. Atteinte rénale

Tout d'abord, les rats 5/6Nx + P ont développé une insuffisance rénale, comme le montrent l'augmentation de la créatinine plasmatique et la réduction du débit de filtration glomérulaire par rapport aux animaux contrôles (figure 30A et 30B) . De plus, les rats 5/6Nx + P présentaient une polydipsie (figure 30C) et une polyurie (figure 30D).

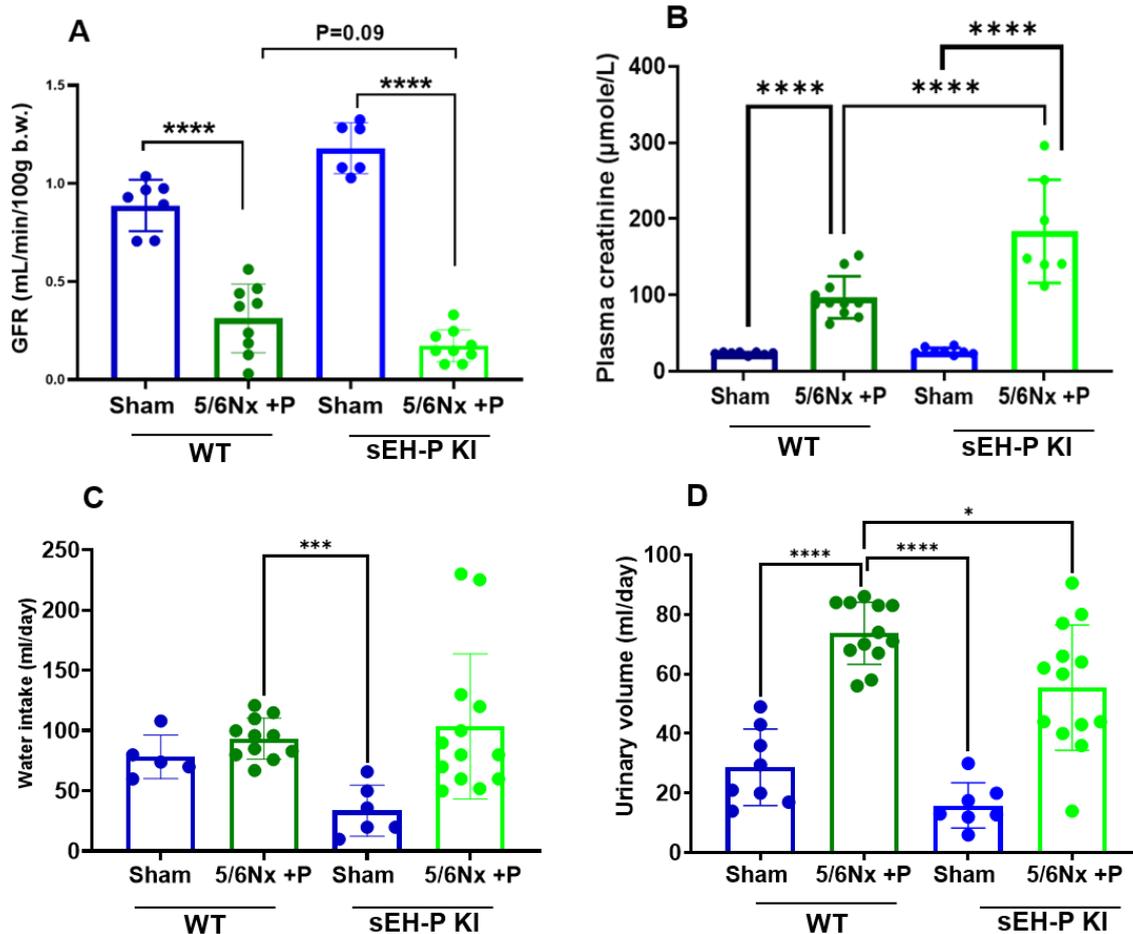


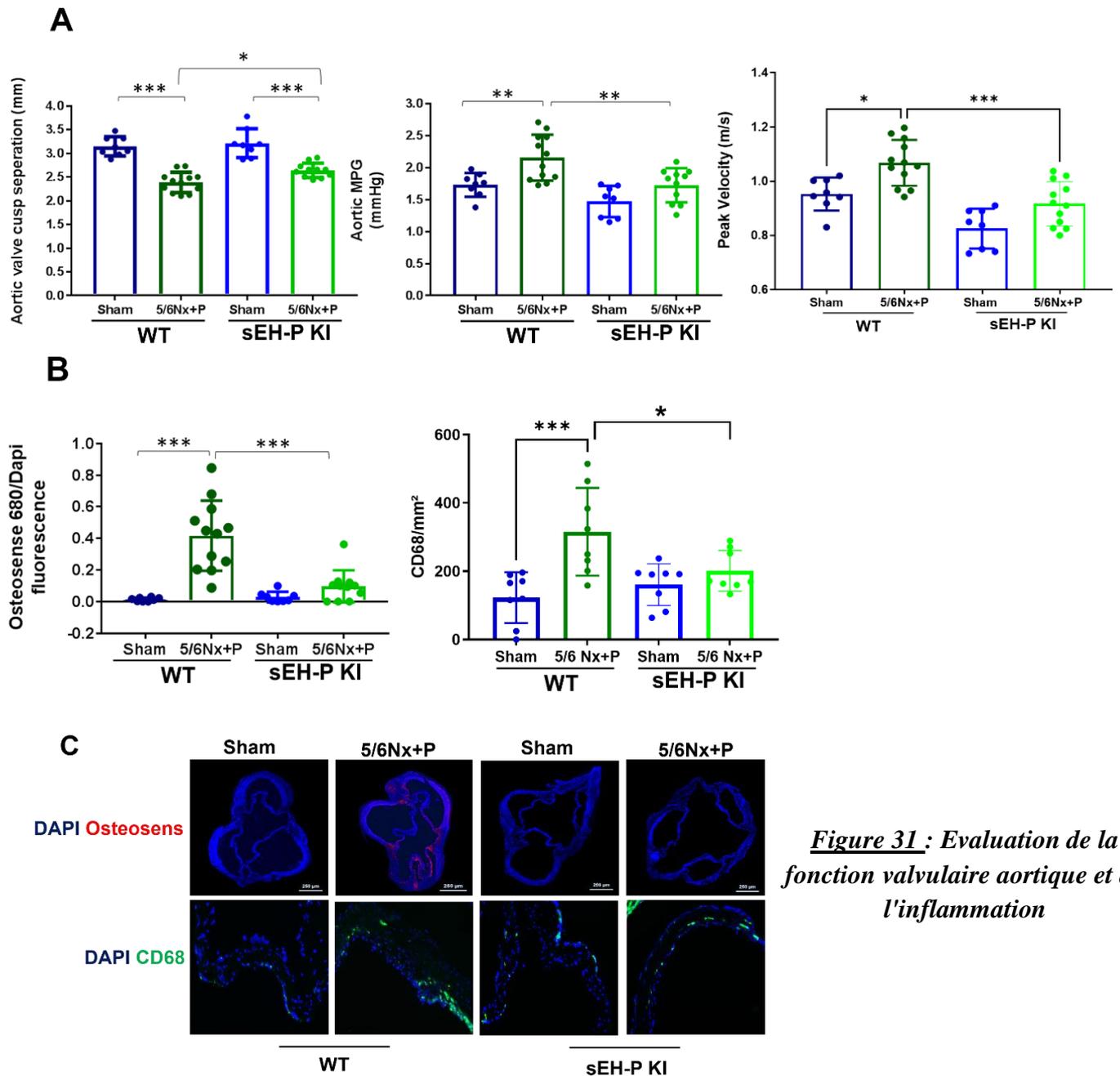
Figure 30 : *Evaluation de la fonction rénale et des paramètres biochimiques*

A) créatinémie plasmatique ; B) débit de filtration glomérulaire (DFG) ; C) volume urinaire et consommation d'eau déterminés chez des rats sauvages (WT) et KI pour la sEH-P ayant subi une opération fantôme (sham) ou une néphrectomie subtotale associée à un régime riche en phosphate (5/6Nx+P) 10 à 11 semaines après la chirurgie. Moyenne±écart-type ; * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

4.3. Calcification de la valve aortique et répercussions hémodynamiques

L'échocardiographie a montré des changements structuraux et hémodynamiques classiques associés à la calcification de la valvule aortique, c'est-à-dire une diminution de l'espace de séparation des cuspides de la valvule aortique et une augmentation de la vitesse maximale et du gradient moyen de pression transvalvulaire (figure 31A). On observe une prévention de ces anomalies chez les rat KI pour l'activité sEH-P. De plus, l'analyse

immunohistologique a permis de montrer que l'inactivation génétique de l'activité sEH-P entraîne une diminution des dépôts d'hydroxyapatite et de l'infiltrat inflammatoire macrophagique au sein de la valve aortique des rats 5/6Nx + P (figure 31B et 31C).



A) Distance intercusps, gradients moyen transvalvulaire aortique et vitesse maximale transaortique ; B, C) images représentatives et valeurs de l'expression des cristaux d'hydroxyapatite des valves aortiques colorées avec l'Osteosense (rouge) et des cellule CD68+ par mm² Vert) et les noyaux sont représentés en bleu (DAPI) des rat WT et sEH-P KI ; Moyenne ± écart-type ; *P < 0,05, *p < 0,01, ***P < 0,001.

4.4. Fonction cardiaque

L'évaluation par échocardiographie a montré la présence d'une dysfonction cardiaque systolique (figure 32A) et diastolique (figure 32B), avec une diminution légère mais significative de la fraction de raccourcissement du VG et une augmentation du rapport E/e' chez les animaux sauvages 5/6Nx + P (figure 32B). De plus, la présence d'un remodelage cardiaque était montrée par l'augmentation non significative du poids du VG et la présence d'une fibrose du VG (figure 32C). L'inhibition de l'activité sEH-P a permis de corriger à la fois les anomalies fonctionnelles et de diminuer la fibrose interstitielle du VG.

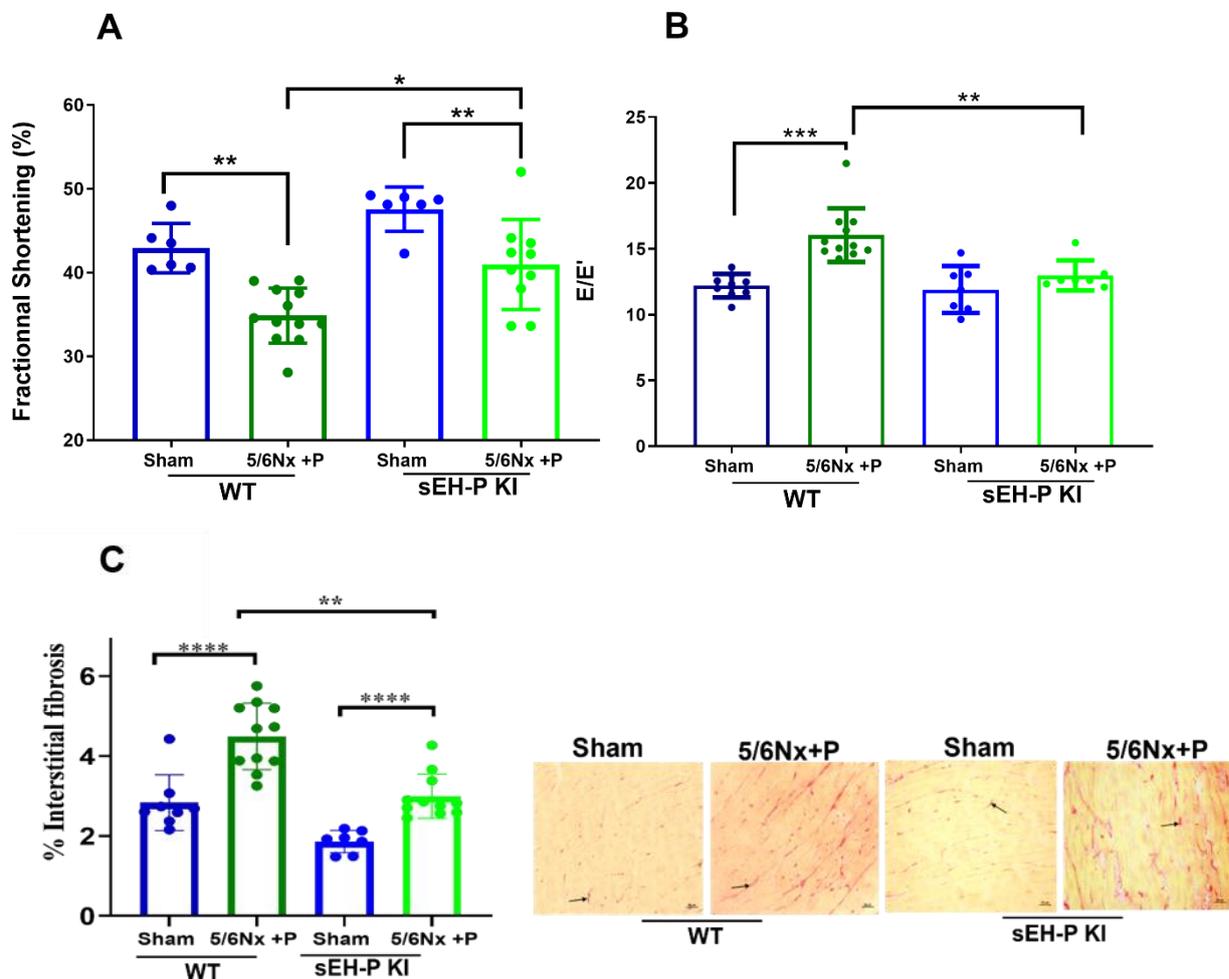


Figure 32 : Évaluation de la fonction ventriculaire gauche

A) Fraction d'éjection ; B) rapport E/e' (afflux mitral onde E/vitesse de l'anneau mitral Doppler tissulaire) ; C) images représentatives de sections du VG colorées en rouge

Sirius et du niveau de fibrose obtenus 10 à 11 semaines après la chirurgie. * $P < 0,05$, * $p < 0,01$, *** $P < 0,001$.

4.5. Fonction vasculaire et pression artérielle

On observe une diminution de la dilatation endothélium-dépendante en réponse au flux chez les animaux sauvages 5/6Nx + P en comparaison aux animaux contrôles et cette diminution est significativement moindre chez les animaux invalidés pour la sEH-P (figure 33A). De plus, il existe une baisse significative de la dilatation endothélium-indépendante en réponse au nitroprussiate de sodium (SNP) chez les animaux sauvages 5/6Nx +P WT en comparaison aux rats contrôles qui est également prévenu chez les rats KI pour l'activité sEH-P (figure 33B). D'autre part, l'élévation de la pression artérielle systolique témoignant du développement d'une hypertension artérielle chez les animaux 5/6Nx + P est également prévenue par l'inhibition de l'activité sEH-P (figure 33C).

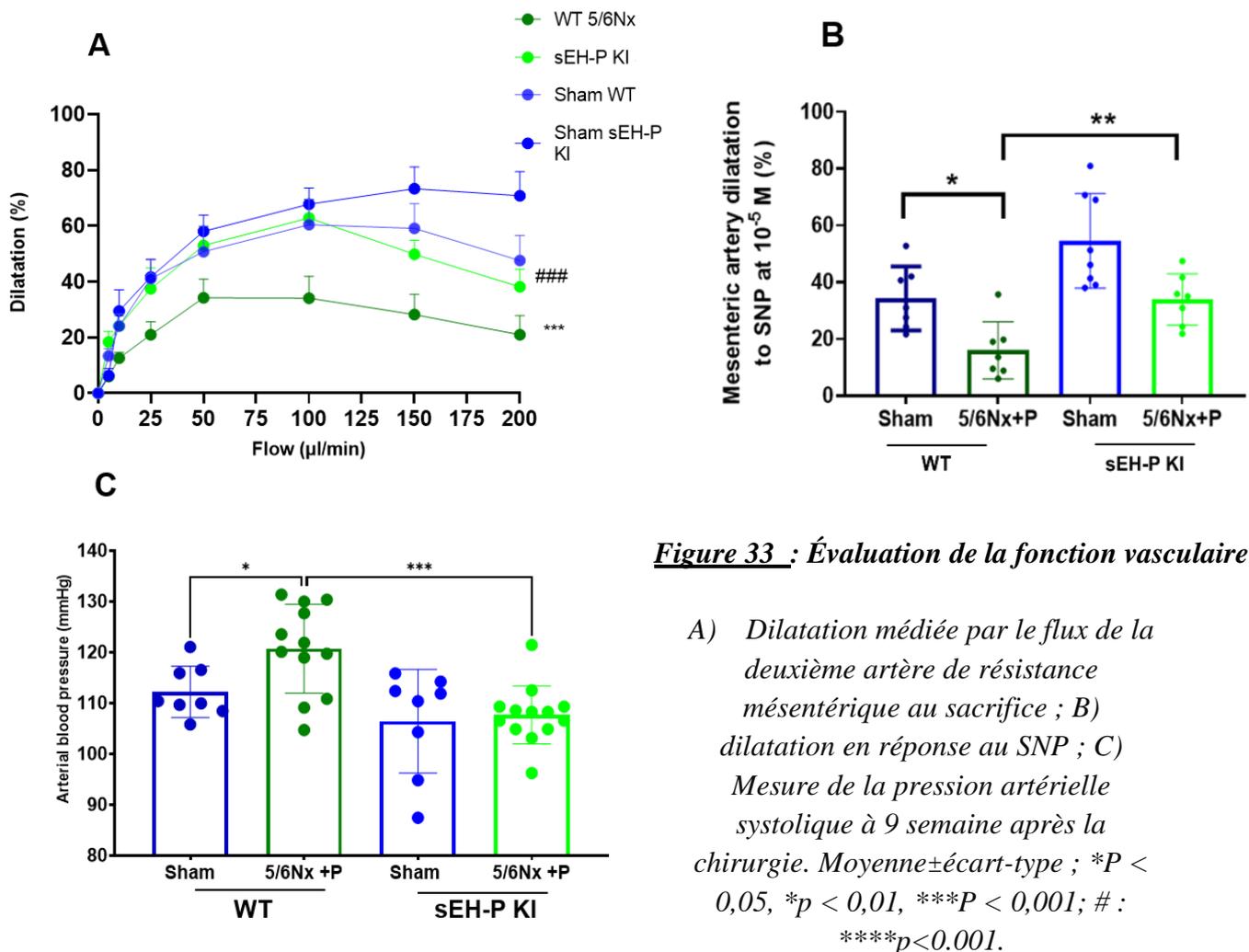


Figure 33 : Évaluation de la fonction vasculaire

A) Dilatation médiée par le flux de la deuxième artère de résistance mésentérique au sacrifice ; B) dilatation en réponse au SNP ; C) Mesure de la pression artérielle systolique à 9 semaines après la chirurgie. Moyenne ± écart-type ; * $P < 0,05$, * $p < 0,01$, *** $P < 0,001$; # : **** $p < 0,001$.

Discussion

Nos résultats mettent en évidence pour la première fois le rôle de l'activité sEH-P dans la physiopathologie des calcifications cardiovasculaires. Cette activité potentialise le processus de calcification à travers la dégradation de PPi et des LPAs intracellulaires, ces derniers étant impliqués dans l'activation du récepteur PPAR γ .

Concernant la calcification vasculaire, les expériences tout d'abord menées *ex vivo* ont démontré que la diminution de l'activité de la sEH-P au moyen de nos approches pharmacologique et génétique aboutit à une baisse de la calcification d'anneaux aortiques de rat mis en culture dans un milieu enrichi en phosphate. Cette réduction est notamment associée à la prévention d'une augmentation des niveaux d'expression d'ARNm de Msx2 et Sox9, induits par ces niveaux élevés de phosphate. Cela indique une diminution de la transition ostéochondrogénique des CMLVs. Msx2 est un facteur ostéogénique, tandis que Sox9 est un facteur chondrogénique, ces deux facteurs exercent des effets opposés sur les niveaux d'expression de Runx2. Cela pourrait expliquer pourquoi l'abolition de l'activité sEH-P n'a pas eu d'effet significatif sur l'expression de Runx2. Ainsi, Varennes *et al.* ont démontré que l'inhibition de l'activité de la sEH-H entraîne une augmentation de l'expression de Runx2, tandis que nos résultats montrent que l'inhibition de l'activité sEH-P régule négativement Msx2 et Sox9, qui sont des régulateurs en amont de Runx2. Ceci suggère que le domaine phosphatase de la sEH pourrait avoir un effet délétère dans les premiers stades de la calcification vasculaire alors que le domaine hydrolase de la sEH pourrait jouer un rôle plus important plus tard dans le processus. Cette hypothèse est étayée par l'observation selon laquelle il n'y a pas de changement dans les niveaux d'expression de Msx2 et Sox9 dans des plaques calcifiées de carotides humaines, tandis que l'expression de Runx2 était notablement augmentée et inversement corrélée à l'expression de sEH (398). Notre étude met également en évidence les mécanismes par lesquels la sEH-P est impliquée dans la calcification vasculaire, notamment via la dégradation du PPi qui inhibe la formation des cristaux d'hydroxyapatite (52,464,465) et celle des LPAs qui n'exercent plus leur effet protecteur via leur récepteur intracellulaire PPAR γ . L'absence d'effet protecteur observée lors de l'inhibition de la sEH-P dans les anneaux aortiques désendothélialisés et dans les CMLVs humaines et de rat suggère fortement que l'effet anticalcifiant de la sEH-P dépend de mécanismes dépendants de l'endothélium. Cela rejoint les données précédentes concernant le rôle de l'activité sEH-H dans l'hydrolyse des facteurs endothéliaux procalcifiants, les EETs (398). La mise en évidence de la libération de PPi par les cellules endothéliales aortiques humaines en culture suggère que la prévention de la dégradation du PPi, provenant des cellules endothéliales, est un mécanisme clé responsable des effets

anticalcifants de l'inhibition du sEH-P. Alors que la TNAP intervient dans la dégradation du PPi au niveau extracellulaire, l'activité de la sEH-P semble ainsi jouer principalement un rôle dans le catabolisme intracellulaire de celui-ci. Ces deux voies sont impliquées dans la régulation de l'équilibre entre le Pi et le PPi et, par conséquent, dans la minéralisation vasculaire (52). De plus, à l'instar de l'effet potentialisateur de l'inhibition du sEH-P sur la thermogénèse (466), nous avons constaté que le blocage du récepteur des LPAs intracellulaires, PPAR γ , atténue également cet effet anticalcifiant. Ce résultat est en accord avec de nombreuses études qui ont démontré l'effet préventif de l'activation de PPAR γ contre la calcification vasculaire notamment via la régulation négative de la voie de signalisation Wnt (467,468). Au niveau extracellulaire, le PPi et les LPAs sont formés par des enzymes appartenant à la famille des ectonucléotides pyrophosphatase/phosphodiesterase (eNPP1 et eNPP2, également connue sous le nom d'autotaxine, respectivement). Au niveau intracellulaire, d'autres voies enzymatiques contribuent à la production intracellulaire des LPAs, au moins quatre voies sont associées à ce processus : (1) la voie de la monoacylglycérol kinase; (2) l'acide phosphatidique-phospholipase A1 ou A2; (3) la voie de synthèse de la glycérophosphate acyltransférase; et (4) la modification oxydative de la voie des LDLs (469,470).

De façon importante, nous avons pu confirmer *in vivo* dans un modèle d'IRC induite par néphrectomie subtotale chez le rat KI pour la sEH-P, les effets bénéfiques de l'inhibition de la sEH-P dans la prévention du développement des calcifications vasculaires. Il faut noter que l'effet anticalcifiant associé à l'inhibition de la sEH-P n'est pas secondaire *in vivo* à une amélioration des anomalies rénales induites par la néphrectomie subtotale. De plus, l'effet préventif de l'inhibition de la sEH-P contre la calcification vasculaire s'accompagne d'une amélioration de la fonction vasculaire et d'une baisse du remodelage cardiaque. Ces résultats soulignent l'importance de cette approche thérapeutique dans le contexte des complications cardiovasculaires liées au développement de l'IRC.

Les données de notre étude étendent les résultats récents ayant montré que la sEH régule également la calcification vasculaire en interagissant avec Sirtuin-3 et en régulant son expression. La diminution de la calcification aortique observée chez les souris délétées génétiquement pour la sEH nourries avec un régime riche en adénine et en phosphate peut être, au moins en partie, attribuée à l'inhibition de l'activité sEH-P (471). Nos travaux ont ainsi permis de mettre en évidence que l'inhibition de l'activité de la sEH-P représente une prometteuse cible thérapeutique afin de prévenir la calcification vasculaire liée au

vieillessement et à certaines pathologies comme l'IRC, et pourrait contribuer à l'amélioration du pronostic cardiovasculaire des patients.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons apporté pour la toute première preuve que l'abolition de l'activité sEH-P diminue également les dépôts de calcium au niveau de la valve aortique et constituerait une approche d'intérêt dans la prise en charge du RAC. Tout d'abord, nous avons pu montrer l'intérêt de l'inhibition pharmacologique de la sEH-P dans la prévention de la calcification de VICs isolées de valves de patients ayant subi un remplacement valvulaire chirurgical mais également sur des valves de rats. Afin de confirmer *in vivo* ces résultats, nous avons choisi d'utiliser à nouveau notre modèle de néphrectomie subtotale chez le rat mais combinée à un régime alimentaire riche en phosphate afin de potentialiser le développement des calcifications valvulaires aortiques. Cette décision découle du fait que l'IRC est un facteur de risque significatif pour le développement de sténose aortique (472,473). De plus, des recherches récentes ont établi un lien entre l'IRC et l'apparition de calcifications au niveau des valves cardiaques (474). Les rats soumis à une néphrectomie subtotale en combinaison avec un régime riche en phosphate ont rapidement développé toutes les caractéristiques de l'IRC. Cela s'est manifesté par un effondrement de la fonction rénale, un état urémique et une anémie. De manière intéressante, même en l'absence de modifications dans les niveaux de calcium et de phosphore dans le plasma, les animaux ont présenté des calcifications au niveau de la valve aortique. Pour mettre en évidence ces calcifications, nous avons utilisé un analogue synthétique de bisphosphonate fluorescent, possédant une forte affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite (475). Ceci a permis de corroborer les conclusions antérieures obtenues au moyen de techniques basées sur la microscopie électronique et la diffraction des rayons X (474). De façon intéressante, nous avons montré par échocardiographie que ce modèle était associé, 10 semaines après la néphrectomie et le début du régime alimentaire, à l'initiation d'un RAC avec une augmentation du gradient moyen transvalvulaire aortique, de la vitesse maximale et une diminution de la distance intercuspidale. Même si ces anomalies restaient peu marquées, ce modèle permet ainsi d'évaluer *in vivo* et assez rapidement l'intérêt de nouvelles thérapeutiques pour la prise en charge du RAC. De manière similaire à ce que l'on observe dans l'IRC chez l'homme, notre modèle se caractérisait également par l'apparition d'une hypertension, d'une légère atteinte cardiaque diastolique et systolique, d'une hypertrophie cardiaque et d'une altération de la fonction endothéliale.

Dans ce modèle, l'abolition de l'activité sEH-P n'a pas entraîné une nouvelle fois d'amélioration de la fonction rénale ou de l'état urémique et anémique des animaux associée

au développement de l'IRC. Dans ce contexte, nous avons pu confirmer chez les rat KI pour la sEH-P une diminution des calcifications de la valve aortique évaluée en histologie. De plus, nous avons démontré une baisse significative de l'espace intercusps par échocardiographie et une moindre augmentation de la vélocité maximale et du gradient de pression moyen transvalvulaire, démontrant que l'inhibition de la sEH-P pourrait permettre de limiter le développement du RAC. Par rapport aux animaux sauvages, nous avons démontré également dans ce modèle une baisse de l'infiltrat inflammatoire, principalement macrophagique, au niveau valvulaire aortique chez les animaux dépourvus de l'activité sEH-P. ces effets anti-inflammatoires peuvent être liés potentiellement à l'activation du récepteur PPAR γ par les substrats endogènes de la sEH-P, les LPAs intracellulaires. En effet, plusieurs études ont mis en évidence le rôle ce récepteur dans la régulation des processus inflammatoires. Il est important de noter que PPAR γ peut exercer une régulation négative sur d'autres facteurs de transcription, notamment dans le contexte de la transrépression (476). Des recherches antérieures ont déjà établi que PPAR γ possède des propriétés anti-inflammatoires, notamment en modulant la signalisation de NF κ B, principalement au sein des macrophages du système immunitaire inné. De plus, il a été constaté que ces cellules ont la capacité de produire divers ligands qui activent PPAR γ , renforçant ainsi les effets anti-inflammatoires et de résolution de ce récepteur sur d'autres types cellulaires.

Enfin, cette étude met à nouveau en lumière l'intérêt du blocage de la sEH-P dans la prévention de la dysfonction vasculaire, démontrée par une augmentation de la dilatation au flux observée au niveau d'artères mésentériques isolées chez les rats KI. Ces résultats peuvent être expliqués par le rôle de l'activité sEH-P dans la régulation de la voie de la eNOS et la production du NO (426). De plus, l'inhibition de la sEH-P a prévenu l'augmentation de la pression artérielle dans ce modèle. L'hypertension artérielle représente l'une des principales complications de l'IRC (477). Bien que les effets antihypertenseurs de l'inhibition de l'activité sEH-H soient bien démontrés dans différents modèles expérimentaux (357,478–480), ceux de l'inhibition de l'activité sEH-P restent mal connus.

Ainsi, l'ensemble des travaux réalisés montrent que la sEH-P constitue une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt pour la prise en charge des calcifications vasculaires et valvulaires aortiques. D'autres expériences seront nécessaires afin de confirmer nos résultats. En particulier, dans la mesure où ils ont été principalement obtenus à partir d'un modèle transgénique où l'activité sEH-P est supprimée dès l'embryogenèse, il est impératif de disposer d'un inhibiteur pharmacologique spécifique de l'activité sEH-P utilisable dans des études

chroniques *in vivo*. Ceci nous permettra de démontrer que l'activité sEH-P constitue effectivement une cible pharmacologique potentielle pour ralentir la progression et l'étendue des calcifications cardiovasculaires et le développement des complications associées chez les patients.

Conclusion et perspectives

L'ensemble de nos conclusions met en lumière l'importance centrale de la sEH-P dans le développement des calcifications cardiovasculaires. Nos résultats dans un premier temps montrent que l'inhibition du sEH-P empêche le développement de la calcification vasculaire. En effet, l'inhibition de cette enzyme entraîne une diminution de la dégradation de PPi et une activation du récepteur aux LPAs. sEH-P représenterait alors une approche thérapeutique prometteuse pour limiter le développement des complications cardiovasculaires des patients atteints d'insuffisance rénale chronique. Bien qu'il existe très peu de modèles expérimentaux reproduisant un RAC, l'association d'un régime riche en phosphate avec une néphrectomie des 5/6^{ème} nous a permis le développement d'une calcification valvulaire aortique avec des répercussions structurelles et hémodynamiques significatives. De plus, ~~En réponse à~~ l'inactivation génétique de l'activité sEH-P dans ce modèle prévient le développement de calcification de la valve aortique et de ses conséquences hémodynamiques. Il est essentiel d'avoir à notre disposition un inhibiteur pharmacologique spécifique de l'activité sEH-P qui puisse être utilisé dans des études *in vivo* à long terme. Cela nous permettra de prouver que l'activité sEH-P peut réellement servir de cible pharmacologique prometteuse pour ralentir la progression et l'ampleur des calcifications cardiovasculaires, ainsi que pour prévenir le développement des complications chez les patients.

En conclusion, le blocage de l'activité de la sEH-P offre une opportunité exceptionnelle pour créer une toute nouvelle catégorie de médicaments visant à réduire le développement des calcifications vasculaires chez les individus souffrant d'insuffisance rénale chronique, de diabète et chez les personnes âgées. Cela revêt une importance particulière, étant donné qu'actuellement, il n'existe aucun traitement thérapeutique efficace pour gérer les calcifications vasculaires.

Valorisation scientifique

Publications

Hind Messaoudi, Thomas Levesque, Nicolas Perzo, Elodie Berg, Guillaume Feugray, Anaïs Dumesnil, Valéry Brunel, Dominique Guerrot, Hélène Eltchaninoff, Vincent Richard, Saïd Kamel, Eric Durand, Youssef Bennis, Jérémy Bellien. *Subtotal Nephrectomy Associated with a High-Phosphate Diet in Rats Mimics the Development of Calcified Aortic Valve Disease Associated with Chronic Renal Failure*. Journal of Clinical Medicine (2023).

Matthieu Leuillier, Thomas Duflot, Séverine Ménoret, Hind Messaoudi, Zoubir Djerda, Déborah Groussard, Raphaël G P Denis, Laurence Chevalier, Ahmed Karoui, Baptiste Panthu, Pierre-Alain Thiébaud, Isabelle Scmitz-Afonso, Séverine Nobis, Cynthia Campart, Tiphaine Henry, Camille Sautreuil, Serge H Luquet, Olivia Beseme, Catherine Féliu, Hélène Peyret, Lionel Nicol, Jean-Paul Henry, Sylvanie Renet, Paul Mulder, Debin Wan, Laurent Tesson, Jean-Marie Heslan, Angéline Duché, Sébastien Jacques, Frédéric Ziegler, Valéry Brunel, Gilles J P Rautureau, Christelle Monteil, Jean-Luc do Rego, Jean-Claude do Rego, Carlos Afonso, Bruce Hammock, Anne-Marie Madec, Florence Pinet, Vincent Richard, Ignacio Anegon, Christophe Guignabert, Christophe Morisseau, Jérémy Bellien. *CRISPR/Cas9-mediated inactivation of the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase prevents obesity and cardiac ischemic injury*. Journal of Advanced Research (2023).

Kawthar Dhayni, Yuthiline Chabry, Lucie Hénaut, Carine Avondo, Cedric Boudot, Hakim Ouled-Haddou, Edith Bigot-Corbel, Gilles Touati, Thierry Caus, Hind Messaoudi, Jérémy Bellien, Christophe Tribouilloy, David Messika-Zeitoun, Kazem Zibara, Saïd Kamel, Youssef Bennis. *Aortic valve calcification is promoted by interleukin-8 and restricted through antagonizing CXC motif chemokine receptor 2*. Cardiovascular Research (2023).

Thomas Duflot, Ly Tu, Matthieu Leuillier, Hind Messaoudi, Déborah Groussard, Guillaume Feugray, Saïda Azhar, Raphaël Thuiller, Fabrice Bauer, Marc Humbert, Vincent Richard,

Christophe Guignabert, Jérémy Bellien. *Preventing the Increase in Lysophosphatidic Acids: A New Therapeutic Target in Pulmonary Hypertension?* Metabolites (2021).

Communications orales

Inhibiting the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase reduces arterial calcification and prevents the cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Printemps de la cardiologie à Tours, (2022).*

Inhibiting the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase reduces arterial calcification and prevents the cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique à Lille, (2022).*

Inhibiting the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase reduces arterial calcification and prevents the cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Journée Normande de la Recherche Biomédicale à Rouen, (2022).*

Inhibiting the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase reduces arterial calcification and prevents the cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Nouvelle société francophone d'athérosclérose à Biarritz (2023).*

Inhibiting the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase attenuates chronic kidney disease-induced calcific aortic valve disease in rats. *Journée Normande de la Recherche Biomédicale à Rouen (2023).*

Inhibiting the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase attenuates chronic kidney disease-induced calcific aortic valve disease in rats. *Journée de la FHU CARNAVAL à Rouen (2023).*

Inhibiting the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase attenuates chronic kidney disease-induced calcific aortic valve disease in rats. *Printemps de la cardiologie à Marseille (2023).*

Communications affichées

Inhibiting the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase reduces arterial calcification and prevents the cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Journée de la FHU CARNAVAL à Rouen (2022).*

Références bibliographiques

1. Shroff RC, Shanahan CM. VASCULAR CALCIFICATION IN PATIENTS WITH KIDNEY DISEASE: The Vascular Biology of Calcification. *Semin Dial* [Internet]. 2007 [cité 5 janv 2023];20(2):103-9.
2. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr Rev.* janv 1989;47(1):23-5.
3. Laura D. Risque cardiovasculaire global en prévention primaire et secondaire : évaluation et prise en charge en médecine de premier recours. 2021;
4. Demer LL, Tintut Y. Vascular Calcification: Pathobiology of a Multifaceted Disease. *Circulation* [Internet]. 3 juin 2008 [cité 6 janv 2023];117(22):2938-48.
5. Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, Weinstein SR, Mosler TP, Tseng PH, et al. Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25,253 patients. *J Am Coll Cardiol.* 8 mai 2007;49(18):1860-70.
6. Les 10 principales causes de mortalité [Internet]. [cité 6 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
7. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* sept 2003;196(3):430-43.
8. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 15 mai 1998;91(10):3527-61.
9. Levick JR. *An Introduction to Cardiovascular Physiology.* Butterworth-Heinemann; 2013. 288 p.
10. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res.* 10 nov 2006;99(10):1044-59.
11. Nigwekar SU, Thadhani R, Brandenburg VM. Calciphylaxis. *N Engl J Med.* 3 mai 2018;378(18):1704-14.
12. McMullen ER, Harms PW, Lowe L, Fullen DR, Chan MP. Clinicopathologic Features and Calcium Deposition Patterns in Calciphylaxis: Comparison With Gangrene, Peripheral Artery Disease, Chronic Stasis, and Thrombotic Vasculopathy. *Am J Surg Pathol.* sept 2019;43(9):1273-81.
13. Kim TI, Guzman RJ. Medial artery calcification in peripheral artery disease. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2023 [cité 25 oct 2023];10.
14. Collins AJ, Foley RN, Herzog C, Chavers BM, Gilbertson D, Ishani A, et al. Excerpts From the US Renal Data System 2009 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* [Internet]. janv 2010 [cité 20 déc 2022];55(1 Suppl 1):S1-A7.
15. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, et al. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med.* 18 mai 2000;342(20):1478-83.
16. Levey AS, Eknoyan G. Cardiovascular disease in chronic renal disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* avr 1999;14(4):828-33.

17. Longenecker JC, Coresh J, Powe NR, Levey AS, Fink NE, Martin A, et al. Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study. *J Am Soc Nephrol JASN*. juill 2002;13(7):1918-27.
18. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C yuan. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 23 sept 2004;351(13):1296-305.
19. Braun J, Oldendorf M, Moshage W, Heidler R, Zeitler E, Luft FC. Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. mars 1996;27(3):394-401.
20. Moe SM, O'Neill KD, Fineberg N, Persohn S, Ahmed S, Garrett P, et al. Assessment of vascular calcification in ESRD patients using spiral CT. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. juin 2003;18(6):1152-8.
21. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular Calcification: The Killer of Patients with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol [Internet]*. 1 juill 2009 [cité 20 déc 2022];20(7):1453-64.
22. Hou YC, Lu CL, Lu KC. Mineral bone disorders in chronic kidney disease. *Nephrol Carlton Vic*. oct 2018;23 Suppl 4:88-94.
23. J B, M C, M L. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN [Internet]*. 7 juill 2015 [cité 15 nov 2022];10(7)
24. Iwasaki Y, Kazama JJ, Yamato H, Matsugaki A, Nakano T, Fukagawa M. Altered material properties are responsible for bone fragility in rats with chronic kidney injury. *Bone*. déc 2015;81:247-54.
25. Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H. Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. oct 2001;38(4 Suppl 1):S34-37.
26. Lieben L, Carmeliet G. Vitamin D signaling in osteocytes: effects on bone and mineral homeostasis. *Bone*. juin 2013;54(2):237-43.
27. Nakatani T, Ohnishi M, Razzaque MS. Inactivation of klotho function induces hyperphosphatemia even in presence of high serum fibroblast growth factor 23 levels in a genetically engineered hypophosphatemic (Hyp) mouse model. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. nov 2009;23(11):3702-11.
28. Martin A, David V, Quarles LD. REGULATION AND FUNCTION OF THE FGF23/KLOTHO ENDOCRINE PATHWAYS. *Physiol Rev [Internet]*. janv 2012 [cité 23 août 2023];92(1):131-55.
29. Parker BD, Schurgers LJ, Brandenburg VM, Christenson RH, Vermeer C, Ketteler M, et al. The Associations of Fibroblast Growth Factor 23 and Uncarboxylated Matrix Gla Protein With Mortality in Coronary Artery Disease: The Heart and Soul Study. *Ann Intern Med [Internet]*. 18 mai 2010 [cité 15 nov 2022];152(10):640-8.
30. Seiler S, Reichart B, Roth D, Seibert E, Fliser D, Heine GH. FGF-23 and future cardiovascular events in patients with chronic kidney disease before initiation of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. déc 2010;25(12):3983-9.

31. Potts JT, Kronenberg HM, Rosenblatt M. Parathyroid hormone: chemistry, biosynthesis, and mode of action. *Adv Protein Chem.* 1982;35:323-96.
32. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective. *Kidney Int.* nov 2006;70(9):1548-59.
33. Bergwitz C, Jüppner H. Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med [Internet].* 2010 [cité 23 août 2023];61(1):91-104.
34. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res.* 24 juin 2011;109(1):e1-12.
35. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, et al. Inactivation of the Osteopontin Gene Enhances Vascular Calcification of Matrix Gla Protein-deficient Mice : Evidence for Osteopontin as an Inducible Inhibitor of Vascular Calcification In Vivo. *J Exp Med [Internet].* 14 oct 2002 [cité 22 déc 2022];196(8):1047-55.
36. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of Osteopontin Is Required for Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Calcification *. *J Biol Chem [Internet].* 30 juin 2000 [cité 22 déc 2022];275(26):20197-203.
37. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet].* nov 2007 [cité 22 déc 2022];27(11):2302-9.
38. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell [Internet].* 17 avr 1998 [cité 22 déc 2022];93(2):165-76.
39. Orita Y, Yamamoto H, Kohno N, Sugihara M, Honda H, Kawamata S, et al. Role of Osteoprotegerin in Arterial Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet].* sept 2007 [cité 22 déc 2022];27(9):2058-64.
40. Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, et al. Osteoprotegerin Inactivation Accelerates Advanced Atherosclerotic Lesion Progression and Calcification in Older ApoE^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet].* sept 2006 [cité 22 déc 2022];26(9):2117-24.
41. Cai MMX, Smith ER, Holt SG. The role of fetuin-A in mineral trafficking and deposition. *BoneKEY Rep [Internet].* 6 mai 2015 [cité 16 nov 2022];4:672.
42. Herrmann M, Kinkeldey A, Jahnen-Dechent W. Fetuin-A function in systemic mineral metabolism. *Trends Cardiovasc Med.* nov 2012;22(8):197-201.
43. Matsui I, Hamano T, Mikami S, Fujii N, Takabatake Y, Nagasawa Y, et al. Fully phosphorylated fetuin-A forms a mineral complex in the serum of rats with adenine-induced renal failure. *Kidney Int.* mai 2009;75(9):915-28.
44. Bostom A, Pasch A, Madsen T, Roberts MB, Franceschini N, Steubl D, et al. Serum Calcification Propensity and Fetuin-A: Biomarkers of Cardiovascular Disease in Kidney Transplant Recipients. *Am J Nephrol.* 2018;48(1):21-31.

45. Carracedo M, Bäck M. Fetuin A in aortic stenosis and valve calcification: Not crystal clear. *Int J Cardiol.* 15 août 2018;265:77-8.
46. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, et al. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest.* août 2003;112(3):357-66.
47. Nigwekar SU, Bloch DB, Nazarian RM, Vermeer C, Booth SL, Xu D, et al. Vitamin K-Dependent Carboxylation of Matrix Gla Protein Influences the Risk of Calciphylaxis. *J Am Soc Nephrol JASN.* juin 2017;28(6):1717-22.
48. Roy ME, Nishimoto SK. Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone.* août 2002;31(2):296-302.
49. Zebboudj AF, Shin V, Boström K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem.* 1 nov 2003;90(4):756-65.
50. Cancela ML, Laizé V, Conceição N, Kempf H, Murshed M. Keutel Syndrome, a Review of 50 Years of Literature. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:642136.
51. Leroux-Berger M, Queguiner I, Maciel TT, Ho A, Relaix F, Kempf H. Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* juill 2011;26(7):1543-53.
52. Villa-Bellosta R. Vascular Calcification: Key Roles of Phosphate and Pyrophosphate. *Int J Mol Sci.* 17 déc 2021;22(24):13536.
53. Heinonen JK. Biological Role of Inorganic Pyrophosphate. Springer Science & Business Media; 2001. 266 p.
54. Orriss IR, Arnett TR, Russell RGG. Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. *Curr Opin Pharmacol [Internet].* 1 juin 2016 [cité 23 août 2023];28:57-68.
55. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* sept 2012;8(3):437-502.
56. Szeri F, Lundkvist S, Donnelly S, Engelke UFH, Rhee K, Williams CJ, et al. The membrane protein ANKH is crucial for bone mechanical performance by mediating cellular export of citrate and ATP. *PLoS Genet [Internet].* 8 juill 2020 [cité 17 nov 2022];16(7):e1008884.
57. Jansen RS, Duijst S, Mahakena S, Sommer D, Szeri F, Váradi A, et al. ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* sept 2014;34(9):1985-9.
58. Marks J, Debnam ES, Unwin RJ. Phosphate homeostasis and the renal-gastrointestinal axis. *Am J Physiol-Ren Physiol [Internet].* août 2010 [cité 24 août 2023];299(2):F285-96.
59. Rahabi-Layachi H, Six I, Kamel S. L'excès de phosphate peut-il s'avérer aussi dangereux pour le système cardiovasculaire que l'excès de cholestérol ? *Rev Francoph Lab [Internet].* 1 nov 2015 [cité 24 août 2023];2015(476):27-34.

60. Simionescu A, Philips K, Vyavahare N. Elastin-derived peptides and TGF-beta1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 26 août 2005;334(2):524-32.
61. Shantouf R, Kovesdy CP, Kim Y, Ahmadi N, Luna A, Luna C, et al. Association of serum alkaline phosphatase with coronary artery calcification in maintenance hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. juin 2009;4(6):1106-14.
62. Holick MF. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* [Internet]. 19 juill 2007 [cité 22 août 2023];357(3):266-81. Disponible sur: <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>
63. Guessous I, McClellan W, Kleinbaum D, Vaccarino V, Zoller O, Theler JM, et al. Comparisons of Serum Vitamin D Levels, Status, and Determinants in Populations With and Without Chronic Kidney Disease Not Requiring Renal Dialysis: A 24-Hour Urine Collection Population-Based Study. *J Ren Nutr* [Internet]. 1 sept 2014 [cité 29 août 2023];24(5):303-12.
64. Shioi A, Mori K, Jono S, Wakikawa T, Hiura Y, Koyama H, et al. Mechanism of atherosclerotic calcification. *Z Für Kardiologie* [Internet]. 1 févr 2000 [cité 21 déc 2022];89(2):S075-9.
65. Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T, Port FK. Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol JASN*. oct 2001;12(10):2131-8.
66. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol*. 2012;74:13-40.
67. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell* [Internet]. 30 mai 1997 [cité 22 déc 2022];89(5):747-54.
68. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebbersold R, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of *Cbfa1* and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res*. 7 déc 2001;89(12):1147-54.
69. Shao JS, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juill 2006;26(7):1423-30.
70. Kawai-Kowase K, Owens GK. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. janv 2007;292(1):C59-69.
71. Iyemere VP, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J Intern Med* [Internet]. 2006 [cité 22 déc 2022];260(3):192-210.
72. Ikeda K, Souma Y, Akakabe Y, Kitamura Y, Matsuo K, Shimoda Y, et al. Macrophages play a unique role in the plaque calcification by enhancing the osteogenic signals exerted by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 17 août 2012;425(1):39-44.
73. Lencel P, Delplace S, Pilet P, Leterme D, Miellot F, Sourice S, et al. Cell-specific effects of TNF- α and IL-1 β on alkaline phosphatase: implication for syndesmophyte formation and vascular calcification. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. oct 2011;91(10):1434-42.

74. Rutsch F, Vaingankar S, Johnson K, Goldfine I, Maddux B, Schauerte P, et al. PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. *Am J Pathol.* févr 2001;158(2):543-54.
75. Chassaing N, Martin L, Calvas P, Le Bert M, Hovnanian A. Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, pathophysiological and genetic update including 11 novel ABCC6 mutations. *J Med Genet.* déc 2005;42(12):881-92.
76. Nitschke Y, Baujat G, Botschen U, Wittkamp T, du Moulin M, Stella J, et al. Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6. *Am J Hum Genet.* 13 janv 2012;90(1):25-39.
77. Albright RA, Stabach P, Cao W, Kavanagh D, Mullen I, Braddock AA, et al. ENPP1-Fc prevents mortality and vascular calcifications in rodent model of generalized arterial calcification of infancy. *Nat Commun.* 1 déc 2015;6:10006.
78. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* sept 2008;83(9):1032-45.
79. Russell RGG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* juill 2011;49(1):2-19.
80. Li Q, Sundberg JP, Levine MA, Terry SF, Uitto J. The effects of bisphosphonates on ectopic soft tissue mineralization caused by mutations in the ABCC6 gene. *Cell Cycle Georget Tex.* 2015;14(7):1082-9.
81. Rutsch F, Böyer P, Nitschke Y, Ruf N, Lorenz-Depierieux B, Wittkamp T, et al. Hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy. *Circ Cardiovasc Genet.* déc 2008;1(2):133-40.
82. Kranenburg G, de Jong PA, Bartstra JW, Lagerweij SJ, Lam MG, Ossewaarde-van Norel J, et al. Etidronate for Prevention of Ectopic Mineralization in Patients With Pseudoxanthoma Elasticum. *J Am Coll Cardiol [Internet].* 1 mars 2018 [cité 7 déc 2022];71(10):1117-26.
83. Shioi A, Morioka T, Shoji T, Emoto M. The Inhibitory Roles of Vitamin K in Progression of Vascular Calcification. *Nutrients [Internet].* 23 févr 2020 [cité 1 sept 2023];12(2):583. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7071387/>
84. Pan MH, Maresz K, Lee PS, Wu JC, Ho CT, Popko J, et al. Inhibition of TNF- α , IL-1 α , and IL-1 β by Pretreatment of Human Monocyte-Derived Macrophages with Menaquinone-7 and Cell Activation with TLR Agonists In Vitro. *J Med Food.* juill 2016;19(7):663-9.
85. Ohsaki : la vitamine K supprime les effets induits par les lipopolysaccharides... - Google Scholar [Internet]. [cité 1 sept 2023].
86. Shea MK, Dallal GE, Dawson-Hughes B, Ordovas JM, O'Donnell CJ, Gundberg CM, et al. Vitamin K, circulating cytokines, and bone mineral density in older men and women. *Am J Clin Nutr.* août 2008;88(2):356-63.
87. Shea MK, Cushman M, Booth SL, Burke GL, Chen H, Kritchevsky SB. Associations between vitamin K status and haemostatic and inflammatory biomarkers in community-dwelling adults. The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2 sept 2014;112(3):438-44.

88. Shea MK, O'Donnell CJ, Hoffmann U, Dallal GE, Dawson-Hughes B, Ordovas JM, et al. Vitamin K supplementation and progression of coronary artery calcium in older men and women. *Am J Clin Nutr.* juin 2009;89(6):1799-807.
89. Kurnatowska I, Grzelak P, Masajtis-Zagajewska A, Kaczmarska M, Stefańczyk L, Vermeer C, et al. Effect of vitamin K2 on progression of atherosclerosis and vascular calcification in nondialyzed patients with chronic kidney disease stages 3-5. *Pol Arch Med Wewn.* 2015;125(9):631-40.
90. Ikari Y, Torii S, Shioi A, Okano T. Impact of menaquinone-4 supplementation on coronary artery calcification and arterial stiffness: an open label single arm study. *Nutr J.* 12 mai 2016;15(1):53.
91. O'Neill WC, Lomashvili KA, Malluche HH, Faugere MC, Riser BL. Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int.* mars 2011;79(5):512-7.
92. O'Neill WC, Sigrist MK, McIntyre CW. Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* janv 2010;25(1):187-91.
93. Riser BL, Barreto FC, Rezg R, Valaitis PW, Cook CS, White JA, et al. Daily peritoneal administration of sodium pyrophosphate in a dialysis solution prevents the development of vascular calcification in a mouse model of uraemia. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* oct 2011;26(10):3349-57.
94. Pomozi V, Brampton C, van de Wetering K, Zoll J, Calio B, Pham K, et al. Pyrophosphate Supplementation Prevents Chronic and Acute Calcification in ABCC6-Deficient Mice. *Am J Pathol.* juin 2017;187(6):1258-72.
95. Shimada BK, Pomozi V, Zoll J, Kuo S, Martin L, Le Saux O. ABCC6, Pyrophosphate and Ectopic Calcification: Therapeutic Solutions. *Int J Mol Sci.* 27 avr 2021;22(9):4555.
96. Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int.* mai 2008;73(9):1024-30.
97. Narisawa S, Harmey D, Yadav MC, O'Neill WC, Hoylaerts MF, Millán JL. Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* nov 2007;22(11):1700-10.
98. Ziegler SG, Ferreira CR, MacFarlane EG, Riddle RC, Tomlinson RE, Chew EY, et al. Ectopic calcification in pseudoxanthoma elasticum responds to inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *Sci Transl Med.* 7 juin 2017;9(393):eaal1669.
99. Pinkerton AB, Sergienko E, Bravo Y, Dahl R, Ma CT, Sun Q, et al. Discovery of 5-((5-chloro-2-methoxyphenyl)sulfonamido)nicotinamide (SBI-425), a potent and orally bioavailable tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett [Internet].* 1 janv 2018 [cité 12 déc 2022];28(1):31-4.
100. Tani T, Fujiwara M, Orimo H, Shimizu A, Narisawa S, Pinkerton AB, et al. Inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase protects against medial arterial calcification and improves survival probability in the CKD-MBD mouse model. *J Pathol.* janv 2020;250(1):30-41.
101. Ngoie SM, Mulenga P, Mukuku O, Kakisingi CN, Sangwa CM, Naweji PT, et al. Maladie rénale chronique: facteurs associés, étiologies, caractéristiques clinique et biologique à Lubumbashi en

- République Démocratique du Congo. Pan Afr Med J [Internet]. 15 sept 2017 [cité 16 nov 2022];28:41.
102. Carney EF. The impact of chronic kidney disease on global health. *Nat Rev Nephrol*. mai 2020;16(5):251.
 103. Andrassy KM. Comments on 'KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease'. *Kidney Int* [Internet]. 1 sept 2013 [cité 16 nov 2022];84(3):622-3.
 104. London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. sept 2003;18(9):1731-40.
 105. thannedouche@unistra.fr. <https://duter.unistra.fr>. DUTER; 2023 [cité 25 oct 2023]. DUTER.
 106. Barenbrock M, Spieker C, Hausberg M, Kisters K, Kosch M, Rahn KH. J005: Relationship between parathormone levels and arterial distensibility in renal transplant recipients. *Am J Hypertens* [Internet]. 1 avr 1998 [cité 17 nov 2022];11(S3):178A.
 107. Gauthier-Bastien A, Ung RV, Larivière R, Mac-Way F, Lebel M, Agharazii M. Vascular remodeling and media calcification increases arterial stiffness in chronic kidney disease. *Clin Exp Hypertens N Y N* 1993. 2014;36(3):173-80.
 108. Glassock RJ. Uremic Toxins: What Are They? An Integrated Overview of Pathobiology and Classification. *J Ren Nutr* [Internet]. 1 janv 2008 [cité 6 sept 2023];18(1):2-6.
 109. Lekawanvijit S, Kompa AR, Wang BH, Kelly DJ, Krum H. Cardiorenal syndrome: the emerging role of protein-bound uremic toxins. *Circ Res*. 9 nov 2012;111(11):1470-83.
 110. Lekawanvijit S, Adrahtas A, Kelly DJ, Kompa AR, Wang BH, Krum H. Does indoxyl sulfate, a uraemic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? *Eur Heart J*. juill 2010;31(14):1771-9.
 111. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, et al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. oct 2009;4(10):1551-8.
 112. Dou L, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, et al. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int*. févr 2004;65(2):442-51.
 113. Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, Cerini C, Berland Y, Dignat-George F, et al. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J Thromb Haemost JTH*. juin 2007;5(6):1302-8.
 114. Yu M, Kim YJ, Kang DH. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. janv 2011;6(1):30-9.
 115. Ito S, Osaka M, Higuchi Y, Nishijima F, Ishii H, Yoshida M. Indoxyl Sulfate Induces Leukocyte-Endothelial Interactions through Up-regulation of E-selectin. *J Biol Chem* [Internet]. 10 déc 2010 [cité 6 sept 2023];285(50):38869-75.

116. Shen WC, Liang CJ, Huang TM, Liu CW, Wang SH, Young GH, et al. Indoxyl sulfate enhances IL-1 β -induced E-selectin expression in endothelial cells in acute kidney injury by the ROS/MAPKs/NF κ B/AP-1 pathway. *Arch Toxicol*. nov 2016;90(11):2779-92.
117. Ito S, Yoshida M. Protein-Bound Uremic Toxins: New Culprits of Cardiovascular Events in Chronic Kidney Disease Patients. *Toxins* [Internet]. 20 févr 2014 [cité 6 sept 2023];6(2):665-78.
118. Covic A, Vervloet M, Massy ZA, Torres PU, Goldsmith D, Brandenburg V, et al. Bone and mineral disorders in chronic kidney disease: implications for cardiovascular health and ageing in the general population. *Lancet Diabetes Endocrinol*. avr 2018;6(4):319-31.
119. Muteliefu G, Enomoto A, Jiang P, Takahashi M, Niwa T. Indoxyl sulphate induces oxidative stress and the expression of osteoblast-specific proteins in vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. juill 2009;24(7):2051-8.
120. Zhang H, Chen J, Shen Z, Gu Y, Xu L, Hu J, et al. Indoxyl sulfate accelerates vascular smooth muscle cell calcification via microRNA-29b dependent regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Toxicol Lett*. 1 mars 2018;284:29-36.
121. Chen J, Zhang X, Zhang H, Liu T, Zhang H, Teng J, et al. Indoxyl Sulfate Enhance the Hypermethylation of Klotho and Promote the Process of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Int J Biol Sci* [Internet]. 15 sept 2016 [cité 6 sept 2023];12(10):1236-46.
122. Wu Y, Han X, Wang L, Diao Z, Liu W. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell calcification via the JNK/Pit-1 pathway. *Ren Fail*. nov 2016;38(10):1702-10.
123. Lomashvili : réduction des taux plasmatiques de pyrophosphate... - Google Scholar [Internet]. [cité 12 sept 2023].
124. Villa-Bellosta R, González-Parra E, Egado J. Alkalosis and Dialytic Clearance of Phosphate Increases Phosphatase Activity: A Hidden Consequence of Hemodialysis. *PLOS ONE* [Internet]. 25 juill 2016 [cité 12 sept 2023];11(7):e0159858.
125. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation*. 11 mai 1999;99(18):2434-9.
126. Sigrist MK, Taal MW, Bungay P, McIntyre CW. Progressive Vascular Calcification over 2 Years Is Associated with Arterial Stiffening and Increased Mortality in Patients with Stages 4 and 5 Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 1 nov 2007 [cité 20 déc 2022];2(6):1241-8.
127. Kanemaru K, Seya K, Miki I, Motomura S, Furukawa KI. Calcification of aortic smooth muscle cells isolated from spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Sci*. févr 2008;106(2):280-6.
128. Schor AM, Allen TD, Canfield AE, Sloan P, Schor SL. Pericytes derived from the retinal microvasculature undergo calcification in vitro. *J Cell Sci*. nov 1990;97 (Pt 3):449-61.
129. Ivanov V, Ivanova S, Roomi MW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Extracellular matrix-mediated control of aortic smooth muscle cell growth and migration by a combination of ascorbic acid, lysine, proline, and catechins. *J Cardiovasc Pharmacol*. nov 2007;50(5):541-7.

130. Roszkowska M, Strzelecka-Kiliszek A, Bessueille L, Buchet R, Magne D, Pikula S. Collagen promotes matrix vesicle-mediated mineralization by vascular smooth muscle cells. *J Inorg Biochem* [Internet]. 1 sept 2018 [cité 6 sept 2023];186:1-9.
131. Optimisation des conditions de culture cellulaire et ex vivo pour étudier la calcification vasculaire | PLOS UN [Internet]. [cité 6 sept 2023].
132. Akiyoshi T, Ota H, Iijima K, Son BK, Kahyo T, Setou M, et al. A novel organ culture model of aorta for vascular calcification. *Atherosclerosis*. janv 2016;244:51-8.
133. Herrmann J, Babic M, Tölle M, van der Giet M, Schuchardt M. Research Models for Studying Vascular Calcification. *Int J Mol Sci* [Internet]. janv 2020 [cité 6 sept 2023];21(6):2204.
134. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 6 mars 1997;386(6620):78-81.
135. Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost*. déc 1999;82(6):1764-7.
136. Fleckenstein A, Frey M, Zorn J, Fleckenstein-Grün G. Experimental basis of the long-term therapy of arterial hypertension with calcium antagonists. *Am J Cardiol*. 6 déc 1985;56(16)
137. Thorin E, Henrion D, Oster L, Thorin-Trescases N, Capdeville C, Martin JA, et al. Vascular calcium overload produced by administration of vitamin D3 and nicotine in rats. Changes in tissue calcium levels, blood pressure, and pressor responses to electrical stimulation or norepinephrine in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol*. août 1990;16(2):257-66.
138. Kieffer P, Robert A, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Age-related arterial calcification in rats. *Life Sci*. 5 mai 2000;66(24):2371-81.
139. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial Calcifications, Arterial Stiffness, and Cardiovascular Risk in End-Stage Renal Disease. *Hypertension* [Internet]. oct 2001 [cité 23 déc 2022];38(4):938-42.
140. Price PA, Roublick AM, Williamson MK. Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate. *Kidney Int*. nov 2006;70(9):1577-83.
141. Henley C, Davis J, Miller G, Shatzen E, Cattley R, Li X, et al. The calcimimetic AMG 641 abrogates parathyroid hyperplasia, bone and vascular calcification abnormalities in uremic rats. *Eur J Pharmacol*. 15 août 2009;616(1-3):306-13.
142. Neven E, Dauwe S, De Broe ME, D'Haese PC, Persy V. Endochondral bone formation is involved in media calcification in rats and in men. *Kidney Int*. sept 2007;72(5):574-81.
143. Tamagaki K, Yuan Q, Ohkawa H, Imazeki I, Moriguchi Y, Imai N, et al. Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. mars 2006;21(3):651-9.
144. Shobeiri N, Adams MA, Holden RM. Vascular Calcification in Animal Models of CKD: A Review. *Am J Nephrol* [Internet]. 22 avr 2010 [cité 5 sept 2023];31(6):471-81.

145. REEVES P, Nielsen F, Fahey G. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr.* 1 déc 1993;123.
146. Gagnon RF, Duguid WP. A reproducible model for chronic renal failure in the mouse. *Urol Res.* 1983;11(1):11-4.
147. Davies MR, Lund RJ, Mathew S, Hruska KA. Low turnover osteodystrophy and vascular calcification are amenable to skeletal anabolism in an animal model of chronic kidney disease and the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol JASN.* avr 2005;16(4):917-28.
148. Massy ZA, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, Angulo J, Szumilak D, Mothu N, et al. Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice. *J Am Soc Nephrol JASN.* janv 2005;16(1):109-16.
149. Watanabe K, Fujii H, Goto S, Nakai K, Kono K, Watanabe S, et al. Newly Developed Rat Model of Chronic Kidney Disease–Mineral Bone Disorder. *J Atheroscler Thromb* [Internet]. 1 févr 2018 [cité 5 sept 2023];25(2):170-7.
150. Persy V, Postnov A, Neven E, Dams G, De Broe M, D'Haese P, et al. High-resolution X-ray microtomography is a sensitive method to detect vascular calcification in living rats with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* sept 2006;26(9):2110-6.
151. Médecine Nucléaire et Cardiologie [Internet]. [cité 31 janv 2023]. Disponible sur: <http://www.cardiodiac.net/FonctionnementCoeur.htm>
152. Balloon Dilation of Severe Aortic Stenosis in the Fetus | *Circulation* [Internet]. [cité 18 janv 2023].
153. Science Mission [Internet]. [cité 18 janv 2023]. Dr. Gretchen Mahler. Disponible sur: <http://sciencemission.com/index.php?page=mahler>
154. Stout KK, Otto CM. Indications for aortic valve replacement in aortic stenosis. *J Intensive Care Med* [Internet]. 1 janv 2007 [cité 14 déc 2022];22(1):14-26.
155. Misfeld M, Sievers HH. Heart valve macro- and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29 août 2007;362(1484):1421-36.
156. Payvandi LA, Rigolin VH. Calcific mitral stenosis. *Cardiol Clin* [Internet]. 1 mai 2013 [cité 18 janv 2023];31(2):193-202. Disponible sur: <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2013.03.007>
157. Dreyfus GD, Martin RP, Chan KMJ, Dulguerov F, Alexandrescu C. Functional tricuspid regurgitation: a need to revise our understanding. *J Am Coll Cardiol.* 2 juin 2015;65(21):2331-6.
158. Maladies des valves cardiaques [Internet]. [cité 25 oct 2023]. Disponible sur: <https://www.hug.ch/cardiologie/maladies-valves-cardiaques>
159. Butcher JT, Markwald RR. Valvulogenesis: the moving target. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 29 août 2007 [cité 19 janv 2023];362(1484):1489-503.
160. Bettex DA, Prêtre R, Chassot PG. Is our heart a well-designed pump? The heart along animal evolution. *Eur Heart J.* 7 sept 2014;35(34):2322-32.

161. Combs MD, Yutzey KE. Heart valve development: regulatory networks in development and disease. *Circ Res.* 28 août 2009;105(5):408-21.
162. Gittenberger-de Groot AC, Bartelings MM, Deruiter MC, Poelmann RE. Basics of cardiac development for the understanding of congenital heart malformations. *Pediatr Res.* févr 2005;57(2):169-76.
163. Mookadam F, Thota VR, Garcia-Lopez AM, Emani UR, Alharthi MS, Zamorano J, et al. Unicuspid aortic valve in adults: a systematic review. *J Heart Valve Dis.* janv 2010;19(1):79-85.
164. Yuan SM, Jing H. The bicuspid aortic valve and related disorders. *Sao Paulo Med J Rev Paul Med.* 2010;128(5):296-301.
165. Schoen FJ, Levy RJ. Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res.* 15 déc 1999;47(4):439-65.
166. Latif N, Sarathchandra P, Taylor PM, Antoniw J, Yacoub MH. Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves. *J Heart Valve Dis.* 1 mars 2005;14(2):218-27.
167. Chan MWC, Hinz B, McCulloch CA. Mechanical induction of gene expression in connective tissue cells. *Methods Cell Biol.* 2010;98:178-205.
168. Chester AH, El-Hamamsy I, Butcher JT, Latif N, Bertazzo S, Yacoub MH. The living aortic valve: From molecules to function. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2014;2014(1):52-77.
169. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 avr 2011;63(4-5):242-68.
170. Fernández Esmerats J, Heath J, Jo H. Shear-Sensitive Genes in Aortic Valve Endothelium. *Antioxid Redox Signal.* 1 sept 2016;25(7):401-14.
171. Butcher JT, Tressel S, Johnson T, Turner D, Sorescu G, Jo H, et al. Transcriptional profiles of valvular and vascular endothelial cells reveal phenotypic differences: influence of shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* janv 2006;26(1):69-77.
172. Wu B, Wang Y, Xiao F, Butcher JT, Yutzey KE, Zhou B. Developmental Mechanisms of Aortic Valve Malformation and Disease. *Annu Rev Physiol.* 10 févr 2017;79:21-41.
173. Siney L, Lewis MJ. Nitric oxide release from porcine mitral valves. *Cardiovasc Res.* sept 1993;27(9):1657-61.
174. Mebazaa A, Mayoux E, Maeda K, Martin LD, Lakatta EG, Robotham JL, et al. Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin. *Am J Physiol.* nov 1993;265(5 Pt 2):H1841-1846.
175. Butcher JT, Nerem RM. Valvular endothelial cells regulate the phenotype of interstitial cells in co-culture: effects of steady shear stress. *Tissue Eng.* avr 2006;12(4):905-15.
176. Schoen FJ. Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:161-83.

177. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*. 18 oct 2011;124(16):1783-91.
178. Chen JH, Yip CY, Sone ED, Simmons CA. Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol*. mars 2009;174(3):1109-19.
179. Hajdu Z, Romeo SJ, Fleming PA, Markwald RR, Visconti RP, Drake CJ. Recruitment of bone marrow-derived valve interstitial cells is a normal homeostatic process. *J Mol Cell Cardiol*. déc 2011;51(6):955-65.
180. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology. *Am J Pathol* [Internet]. nov 2007 [cité 13 déc 2022];171(5):1407-18.
181. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kiliç R, Sarikoç A, et al. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*. oct 2003;170(2):205-11.
182. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kiliç R, et al. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol*. 2005;14(2):80-7.
183. Ngo DT, Sverdlov AL, Horowitz JD. Prevention of aortic valve stenosis: a realistic therapeutic target? *Pharmacol Ther*. juill 2012;135(1):78-93.
184. Yip CY, Chen JH, Zhao R, Simmons CA. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juin 2009;29(6):936-42.
185. Monzack EL, Masters KS. Can valvular interstitial cells become true osteoblasts? A side-by-side comparison. *J Heart Valve Dis*. juill 2011;20(4):449-63.
186. Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation*. 28 oct 2008;118(18):1864-80.
187. Charitos EI, Sievers HH. Anatomy of the aortic root: implications for valve-sparing surgery. *Ann Cardiothorac Surg* [Internet]. janv 2013 [cité 20 janv 2023];2(1):53-6.
188. Sacks MS, David Merryman W, Schmidt DE. On the biomechanics of heart valve function. *J Biomech*. 25 août 2009;42(12):1804-24.
189. Gould ST, Srigunapalan S, Simmons CA, Anseth KS. Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease. *Circ Res*. 5 juill 2013;113(2):186-97.
190. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 6 nov 2012;60(19):1854-63.
191. Hinton RB, Yutzey KE. Heart Valve Structure and Function in Development and Disease. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2011 [cité 10 nov 2022];73:29-46.

192. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *Cardiovascular Health Study. J Am Coll Cardiol.* 1 mars 1997;29(3):630-4.
193. Acar J, Sarkis A. Rétrécissement aortique orificiel de l'adulte.
194. Freeze SL, Landis BJ, Ware SM, Helm BM. Bicuspid Aortic Valve: a Review with Recommendations for Genetic Counseling. *J Genet Couns.* déc 2016;25(6):1171-8.
195. Édition professionnelle du Manuel MSD [Internet]. [cité 29 août 2023]. Rétrécissement aortique - Troubles cardiovasculaires.
196. Veinot JP. Pathology of inflammatory native valvular heart disease. *Cardiovasc Pathol [Internet].* 1 sept 2006 [cité 15 déc 2022];15(5):243-51.
197. Maher ER, Young G, Smyth-Walsh B, Pugh S, Curtis JR. Aortic and mitral valve calcification in patients with end-stage renal disease. *Lancet Lond Engl.* 17 oct 1987;2(8564):875-7.
198. Straumann E, Meyer B, Misteli M, Blumberg A, Jenzer HR. Aortic and mitral valve disease in patients with end stage renal failure on long-term haemodialysis. *Br Heart J.* mars 1992;67(3):236-9.
199. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature.* 8 sept 2005;437(7056):270-4.
200. Pohle K, Mäffert R, Ropers D, Moshage W, Stilianakis N, Daniel WG, et al. Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation.* 16 oct 2001;104(16):1927-32.
201. Nightingale AK, Horowitz JD. Aortic sclerosis: not an innocent murmur but a marker of increased cardiovascular risk. *Heart [Internet].* nov 2005 [cité 1 févr 2023];91(11):1389-93.
202. Jade l'équipe S. Aortic Valve Stenosis - Causes, Symptoms, Life Expectancy, Treatment [Internet]. *Health Jade.* 2018 [cité 25 oct 2023]. Disponible sur: <https://healthjade.net/aortic-valve-stenosis/>
203. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J [Internet].* 14 févr 2022 [cité 9 nov 2022];43(7):561-632.
204. Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, Kovanen PT. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol.* oct 2007;18(5):483-91.
205. Sverdlov AL, Ngo DT, Chapman MJ, Ali OA, Chirkov YY, Horowitz JD. Pathogenesis of aortic stenosis: not just a matter of wear and tear. *Am J Cardiovasc Dis [Internet].* 28 juill 2011 [cité 25 janv 2023];1(2):185-99.
206. Otto CM, Burwash IG, Legget ME, Munt BI, Fujioka M, Healy NL, et al. Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome. *Circulation.* 6 mai 1997;95(9):2262-70.

207. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of « degenerative » valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* [Internet]. août 1994 [cité 19 déc 2022];90(2):844-53.
208. Rajamannan NM. Is it time for medical therapy for aortic valve disease? *Expert Rev Cardiovasc Ther* [Internet]. nov 2004 [cité 25 janv 2023];2(6):845-54.
209. Ghaisas NK, Foley JB, O'Briain DS, Crean P, Kelleher D, Walsh M. Adhesion molecules in nonrheumatic aortic valve disease: endothelial expression, serum levels and effects of valve replacement. *J Am Coll Cardiol*. déc 2000;36(7):2257-62.
210. Mahler GJ, Butcher JT. Inflammatory regulation of valvular remodeling: the good(?), the bad, and the ugly. *Int J Inflamm*. 2011;2011:721419.
211. Helske S, Lindstedt KA, Laine M, Mäyränpää M, Werkkala K, Lommi J, et al. Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2 nov 2004 [cité 30 janv 2023];44(9):1859-66.
212. Hypoxia-induced expression of bradykinin type-2 receptors in endothelial cells triggers NO production, cell migration, and angiogenesis - Liesmaa - 2009 - *Journal of Cellular Physiology* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 30 janv 2023].
213. El -Hamamsy Ismail, Balachandran K, Yacoub MH, Stevens LM, Sarathchandra P, Taylor PM, et al. Endothelium-Dependent Regulation of the Mechanical Properties of Aortic Valve Cusps. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 21 avr 2009 [cité 30 janv 2023];53(16):1448-55.
214. Edep ME, Shirani J, Wolf P, Brown DL. Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol* [Internet]. 1 sept 2000 [cité 31 janv 2023];9(5):281-6.
215. Satta J, Oiva J, Salo T, Eriksen H, Ohtonen P, Biancari F, et al. Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis. *Ann Thorac Surg*. 1 oct 2003;76:681-8; discussion 688.
216. Helske S, Laine M, Kupari M, Lommi J, Turto H, Nurmi L, et al. Increased expression of profibrotic neutral endopeptidase and bradykinin type 1 receptors in stenotic aortic valves. *Eur Heart J* [Internet]. 1 août 2007 [cité 31 janv 2023];28(15):1894-903.
217. Kochtebane N, Choqueux C, Passefort S, Nataf P, Messika-Zeitoun D, Bartagi A, et al. Plasmin induces apoptosis of aortic valvular myofibroblasts. *J Pathol*. mai 2010;221(1):37-48.
218. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. juill 2001;86(1):324-33.
219. Fletcher AJ, Sellers SL. Aortic Stenosis: Is Extracellular Matrix the Answer. *JACC Basic Transl Sci* [Internet]. 1 janv 2021 [cité 31 janv 2023];6(1):40-1.
220. Mathieu P, Boulanger MC. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease. *Can J Cardiol*. sept 2014;30(9):982-93.
221. Hinton RB, Lincoln J, Deutsch GH, Osinska H, Manning PB, Benson DW, et al. Extracellular matrix remodeling and organization in developing and diseased aortic valves. *Circ Res*. 9 juin 2006;98(11):1431-8.

222. Soini Y, Salo T, Satta J. Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Hum Pathol.* août 2003;34(8):756-63.
223. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Mukai M, Kimura T, Okada Y, et al. Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. *J Clin Invest* [Internet]. 1 juill 2010 [cité 31 janv 2023];120(7):2292-306.
224. Chalajour F, Treede H, Ebrahimnejad A, Lauke H, Reichenspurner H, Ergun S. Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis. *Exp Cell Res* [Internet]. 1 août 2004 [cité 31 janv 2023];298(2):455-64.
225. Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K, Kimura K, Shiomi T, Kimura N, et al. Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. *Nat Med* [Internet]. oct 2006 [cité 31 janv 2023];12(10):1151-9.
226. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Ko TC, Luo K. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol.* avr 2004;6(4):366-72.
227. Mazzone A, Epistolato MC, De Caterina R, Storti S, Vittorini S, Sbrana S, et al. Neoangiogenesis, T-lymphocyte infiltration, and heat shock protein-60 are biological hallmarks of an immunomediated inflammatory process in end-stage calcified aortic valve stenosis. *J Am Coll Cardiol.* 5 mai 2004;43(9):1670-6.
228. Akahori H, Tsujino T, Naito Y, Matsumoto M, Lee-Kawabata M, Ohyanagi M, et al. Intraleaflet haemorrhage is associated with rapid progression of degenerative aortic valve stenosis. *Eur Heart J* [Internet]. 1 avr 2011 [cité 31 janv 2023];32(7):888-96.
229. Quantification de la calcification dans les lésions athérosclérotiques | Artériosclérose, thrombose et biologie vasculaire [Internet]. [cité 31 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.atv.0000172017.79441.73>
230. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res.* 24 nov 2000;87(11):1055-62.
231. Jian B, Narula N, Li Q yi, Mohler ER, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg.* févr 2003;75(2):457-65; discussion 465-466.
232. Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of Oxidized Low Density Lipoprotein in Nonrheumatic Stenotic Aortic Valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. mai 1999 [cité 31 janv 2023];19(5):1218-22.
233. Mohler ER, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, et al. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis.* 1 mai 1999;8(3):254-60.
234. Mahmut A, Boulanger MC, El Hussein D, Fournier D, Bouchareb R, Després JP, et al. Elevated Expression of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 in Calcific Aortic Valve Disease: Implications for Valve Mineralization. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 11 févr 2014 [cité 31 janv 2023];63(5):460-9.

235. Osman L, Yacoub MH, Latif N, Amrani M, Chester AH. Role of Human Valve Interstitial Cells in Valve Calcification and Their Response to Atorvastatin. *Circulation* [Internet]. 4 juill 2006 [cité 31 janv 2023];114(1_supplement):I-547.
236. Audet A, Côté N, Couture C, Bossé Y, Després JP, Pibarot P, et al. Amyloid substance within stenotic aortic valves promotes mineralization. *Histopathology*. oct 2012;61(4):610-9.
237. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoç A, Kiliç R, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol*. janv 2004;36(1):57-66.
238. Rajamannan NM, Subramaniam M, Caira F, Stock SR, Spelsberg TC. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced calcification in the aortic valves via the Lrp5 receptor pathway. *Circulation* [Internet]. 30 août 2005 [cité 31 janv 2023];112(9 SUPPL.):I229-34.
239. Zhang M, Liu X, Zhang X, Song Z, Han L, He Y, et al. MicroRNA-30b is a multifunctional regulator of aortic valve interstitial cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*. mars 2014;147(3):1073-1080.e2.
240. Schurgers LJ, Cranenburg ECM, Vermeer C. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost*. oct 2008;100(4):593-603.
241. Côté N, El Hussein D, Pépin A, Guauque-Olarte S, Ducharme V, Bouchard-Cannon P, et al. ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve. *J Mol Cell Cardiol*. mai 2012;52(5):1191-202.
242. Hutcheson JD, Chen J, Sewell-Loftin MK, Ryzhova LM, Fisher CI, Su YR, et al. Cadherin-11 regulates cell-cell tension necessary for calcific nodule formation by valvular myofibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. janv 2013;33(1):114-20.
243. El Hussein D, Boulanger MC, Mahmut A, Bouchareb R, Laflamme MH, Fournier D, et al. P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: implication for calcific aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol*. juill 2014;72:146-56.
244. Tantisattamo E, Han KH, O'Neill WC. Increased vascular calcification in patients receiving warfarin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. janv 2015;35(1):237-42.
245. Lindholt JS, Frandsen NE, Fredgart MH, Øvrehus KA, Dahl JS, Møller JE, et al. Effects of menaquinone-7 supplementation in patients with aortic valve calcification: study protocol for a randomised controlled trial. *BMJ Open*. 23 août 2018;8(8):e022019.
246. Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, Schurgers LJ, Knapen MHJ, van der Meer IM, et al. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *J Nutr*. nov 2004;134(11):3100-5.
247. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F, et al. Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation*. 10 déc 2002;106(24):3006-8.
248. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, et al. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*. 21 sept 2017;38(36):2739-91.

249. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med*. 25 sept 2008;359(13):1343-56.
250. Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Lauer MS, Sprecher DL, Griffin BP. Effect of Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors on the Progression of Calcific Aortic Stenosis. *Circulation* [Internet]. 30 oct 2001 [cité 9 nov 2022];104(18):2205-9. 249
251. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 14 juill 2016;37(27):2129-200.
252. O'Brien KD, Shavelle DM, Caulfield MT, McDonald TO, Olin-Lewis K, Otto CM, et al. Association of angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma. *Circulation*. 22 oct 2002;106(17):2224-30.
253. Ngo DT, Stafford I, Sverdlov AL, Qi W, Wuttke RD, Zhang Y, et al. Ramipril retards development of aortic valve stenosis in a rabbit model: mechanistic considerations. *Br J Pharmacol* [Internet]. févr 2011 [cité 9 nov 2022];162(3):722-32.
254. Ardehali R, Leeper NJ, Wilson AM, Heidenreich PA. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins on the progression of aortic sclerosis and mortality. *J Heart Valve Dis*. mai 2012;21(3):337-43.
255. Reyes-Soffer G, Ginsberg HN, Berglund L, Duell PB, Heffron SP, Kamstrup PR, et al. Lipoprotein(a): A Genetically Determined, Causal, and Prevalent Risk Factor for Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. janv 2022 [cité 28 août 2023];42(1):e48-60.
256. Kaiser Y, van der Toorn JE, Singh SS, Zheng KH, Kavousi M, Sijbrands EJG, et al. Lipoprotein(a) is associated with the onset but not the progression of aortic valve calcification. *Eur Heart J* [Internet]. 14 oct 2022 [cité 28 août 2023];43(39):3960-7.
257. Malick WA, Goonewardena SN, Koenig W, Rosenson RS. Clinical Trial Design for Lipoprotein(a)-Lowering Therapies: JACC Focus Seminar 2/3. *J Am Coll Cardiol*. 25 avr 2023;81(16):1633-45.
258. Phase 2 OCEAN(a)-DOSE Study of Olpasiran Demonstrates Continued Reduction of Lp(a) Nearly a Year After the Last Dose | CLD [Internet]. [cité 12 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.hmpgloballearningnetwork.com/site/cathlab/news/phase-2-oceana-dose-study-demonstrates-continued-reduction-lpa-nearly-year-after>
259. Eli Lilly and Company. A Phase 2, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Investigate the Efficacy and Safety of LY3819469 in Adults With Elevated Lipoprotein(a) [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2023 juill [cité 11 sept 2023]. Report No.: NCT05565742.
260. Silence Therapeutics plc. A Multi-centre, Randomised, Double-blind, Placebo-controlled, Phase 2 Study to Investigate Efficacy, Safety and Tolerability of SLN360 in Participants With Elevated Lipoprotein(a) at High Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease Events [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2023 mai [cité 11 sept 2023]. Report No.: NCT05537571. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05537571>

261. Nissen SE, Wolski K, Balog C, Swerdlow DI, Scrimgeour AC, Rambaran C, et al. Single Ascending Dose Study of a Short Interfering RNA Targeting Lipoprotein(a) Production in Individuals With Elevated Plasma Lipoprotein(a) Levels. *JAMA*. 3 mai 2022;327(17):1679-87.
262. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res*. 27 mai 2011;108(11):1392-412.
263. Sider KL, Blaser MC, Simmons CA. Animal models of calcific aortic valve disease. *Int J Inflamm*. 2011;2011:364310.
264. Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, Narumi T, Kadowaki S, Honda Y, et al. A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. févr 2014;34(2):270-8.
265. Niepmann ST, Steffen E, Zietzer A, Adam M, Nordsiek J, Gyamfi-Poku I, et al. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc*. août 2019;108(8):847-56.
266. Hinton RB, Alfieri CM, Witt SA, Glascock BJ, Khoury PR, Benson DW, et al. Mouse heart valve structure and function: echocardiographic and morphometric analyses from the fetus through the aged adult. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. juin 2008;294(6):H2480-2488.
267. Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, Stewart DJ. Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 23 mai 2000;101(20):2345-8.
268. Assessment UENC for E. Aortic Valve Sclerosis in Mice Deficient in Endothelial Nitric Oxide Synthase [Internet]. 2009 [cité 9 nov 2022].
269. Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 1 déc 2009 [cité 9 nov 2022];47(6):828-34.
270. Barrick CJ, Roberts RB, Rojas M, Rajamannan NM, Suitt CB, O'Brien KD, et al. Reduced EGFR causes abnormal valvular differentiation leading to calcific aortic stenosis and left ventricular hypertrophy in C57BL/6J but not 129S1/SvImJ mice. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* [Internet]. juill 2009 [cité 9 nov 2022];297(1):H65-75.
271. Weiss RM, Chu Y, Brooks RM, Lund DD, Cheng J, Zimmerman KA, et al. Discovery of an Experimental Model of Unicuspid Aortic Valve. *J Am Heart Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis* [Internet]. 30 juin 2018 [cité 9 nov 2022];7(13):e006908.
272. Rajamannan NM, Sangiorgi G, Springett M, Arnold K, Mohacsi T, Spagnoli LG, et al. Experimental hypercholesterolemia induces apoptosis in the aortic valve. *J Heart Valve Dis*. mai 2001;10(3):371-4.
273. Filip DA, Nistor A, Bulla A, Radu A, Lupu F, Simionescu M. Cellular events in the development of valvular atherosclerotic lesions induced by experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* [Internet]. 1 oct 1987 [cité 27 août 2023];67(2):199-214.
274. Angiotensin receptor-1 blocker inhibits atherosclerotic changes and endothelial disruption of the aortic valve in hypercholesterolemic rabbits - PubMed [Internet]. [cité 27 août 2023].
275. Drolet MC, Couet J, Arsenault M. Development of aortic valve sclerosis or stenosis in rabbits: role of cholesterol and calcium. *J Heart Valve Dis*. juill 2008;17(4):381-7.

276. Marechaux S, Corseaux D, Vincentelli A, Richardson M, Ung A, Susen S, et al. Identification of tissue factor in experimental aortic valve sclerosis. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol*. 2009;18(2):67-76.
277. Hamilton AM, Boughner DR, Drangova M, Rogers KA. Statin treatment of hypercholesterolemic-induced aortic valve sclerosis. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol*. 2011;20(2):84-92.
278. Cimini M, Boughner DR, Ronald JA, Aldington L, Rogers KA. Development of aortic valve sclerosis in a rabbit model of atherosclerosis: an immunohistochemical and histological study. *J Heart Valve Dis*. mai 2005;14(3):365-75.
279. Ngo DTM, Stafford I, Kelly DJ, Sverdlov AL, Wuttke RD, Weedon H, et al. Vitamin D(2) supplementation induces the development of aortic stenosis in rabbits: interactions with endothelial function and thioredoxin-interacting protein. *Eur J Pharmacol*. 20 août 2008;590(1-3):290-6.
280. Beaty TH, Prenger VL, Virgil DG, Lewis B, Kwiterovich PO, Bachorik PS. A genetic model for control of hypertriglyceridemia and apolipoprotein B levels in the Johns Hopkins colony of St. Thomas Hospital rabbits. *Genetics*. déc 1992;132(4):1095-104.
281. Brousseau ME, Kauffman RD, Herderick EE, Demosky SJ, Evans W, Marcovina S, et al. LCAT modulates atherogenic plasma lipoproteins and the extent of atherosclerosis only in the presence of normal LDL receptors in transgenic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. févr 2000;20(2):450-8.
282. Les lapins transgéniques comme modèles pour la recherche sur l'athérosclérose - PubMed [Internet]. [cité 27 août 2023].
283. Fan J, Watanabe T. Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2000;7(1):26-32.
284. Turk JR, Laughlin MH. Physical activity and atherosclerosis: which animal model? *Can J Appl Physiol Rev Can Physiol Appl*. oct 2004;29(5):657-83.
285. Guerraty M, Mohler Iii ER. Models of aortic valve calcification. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res*. sept 2007;55(6):278-83.
286. Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, Kimsey T. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes*. juill 2001;50(7):1654-65.
287. Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ. Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages. *Am J Pathol*. juin 1979;95(3):775-92.
288. Hamamdžić D, Fenning RS, Patel D, Mohler ER, Orlova KA, Wright AC, et al. Akt pathway is hypoactivated by synergistic actions of diabetes mellitus and hypercholesterolemia resulting in advanced coronary artery disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. sept 2010;299(3):H699-706.
289. Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, Davies PF. Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves. *Circ Res*. 15 avr 2005;96(7):792-9.
290. Guerraty MA, Grant GR, Karanian JW, Chiesa OA, Pritchard WF, Davies PF. Hypercholesterolemia induces side-specific phenotypic changes and peroxisome proliferator-

- activated receptor-gamma pathway activation in swine aortic valve endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* févr 2010;30(2):225-31.
291. Prescott MF, McBride CH, Hasler-Rapacz J, Von Linden J, Rapacz J. Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterolemia bearing mutant alleles for apolipoprotein B. *Am J Pathol.* juill 1991;139(1):139-47.
292. Rapacz J, Hasler-Rapacz J, Taylor KM, Checovich WJ, Attie AD. Lipoprotein mutations in pigs are associated with elevated plasma cholesterol and atherosclerosis. *Science.* 19 déc 1986;234(4783):1573-7.
293. Hasler-Rapacz J, Ellegren H, Fridolfsson AK, Kirkpatrick B, Kirk S, Andersson L, et al. Identification of a mutation in the low density lipoprotein receptor gene associated with recessive familial hypercholesterolemia in swine. *Am J Med Genet.* 13 avr 1998;76(5):379-86.
294. Hasler-Rapacz J, Kempen HJ, Princen HM, Kudchodkar BJ, Lacko A, Rapacz J. Effects of simvastatin on plasma lipids and apolipoproteins in familial hypercholesterolemic swine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* janv 1996;16(1):137-43.
295. Grunwald KA, Schueler K, Uelmen PJ, Lipton BA, Kaiser M, Buhman K, et al. Identification of a novel Arg-->Cys mutation in the LDL receptor that contributes to spontaneous hypercholesterolemia in pigs. *J Lipid Res.* mars 1999;40(3):475-85.
296. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci.* 11 janv 2002;70(8):855-65.
297. Copeland JG, Maron BJ, Luka NL, Ferrans VJ, Michaelis LL. Experimental production of aortic valvular stenosis. Short-term and long-term studies in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* mars 1974;67(3):371-9.
298. Shuvy M, Abedat S, Beeri R, Danenberg HD, Planer D, Ben-Dov IZ, et al. Uraemic hyperparathyroidism causes a reversible inflammatory process of aortic valve calcification in rats. *Cardiovasc Res.* 1 août 2008;79(3):492-9.
299. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.* 1975;56(1):56-64.
300. Carabello BA. The relationship of left ventricular geometry and hypertrophy to left ventricular function in valvular heart disease. *J Heart Valve Dis.* 1 oct 1995;4 Suppl 2:S132-8; discussion S138-9.
301. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990;322(22):1561-6.
302. Spirito P, Bellone P, Harris KM, Bernabò P, Bruzzi P, Maron BJ. Magnitude of left ventricular hypertrophy and risk of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000;342(24):1778-85.
303. Schillaci G, Verdecchia P, Porcellati C, Cuccurullo O, Cosco C, Perticone F. Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension. *Hypertension.* 2000;35(2):580-6.

304. Effet pronostique d'une masse ventriculaire gauche trop élevée dans la sténose aortique sévère asymptomatique | Cœur [Internet]. [cité 24 août 2023].
305. Salcedo EE, Korzick DH, Currie PJ, Stewart WJ, Lever HM, Goormastic M. Determinants of left ventricular hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cleve Clin J Med* [Internet]. 1 sept 1989 [cité 25 août 2023];56(6):590-6. Disponible sur: <https://doi.org/10.3949/ccjm.56.6.590>
306. Dweck MR, Joshi S, Murigu T, Gulati A, Alpendurada F, Jabbour A, et al. Left ventricular remodeling and hypertrophy in patients with aortic stenosis: insights from cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson* [Internet]. 28 juill 2012 [cité 25 août 2023];14(1):50.
307. Lavie CJ, Milani RV, Patel D, Artham SM, Ventura HO. Disparate effects of obesity and left ventricular geometry on mortality in 8088 elderly patients with preserved systolic function. *Postgrad Med*. 2009;121(3):119-25.
308. orlowska-baranowska E, Placha G, Gaciong Z, Baranowski R, Zakrzewski D, Michałek P, et al. Influence of ACE I/D genotypes on left ventricular hypertrophy in aortic stenosis: Gender-related differences. *J Heart Valve Dis*. 1 août 2004;13:574-81.
309. Rieck ÅE, Cramariuc D, Staal EM, Rossebø AB, Wachtell K, Gerds E. Impact of hypertension on left ventricular structure in patients with asymptomatic aortic valve stenosis (a SEAS substudy). *J Hypertens* [Internet]. févr 2010 [cité 25 août 2023];28(2):377.
310. Briand M, Dumesnil JG, Kadem L, Tongue AG, Rieu R, Garcia D, et al. Reduced Systemic Arterial Compliance Impacts Significantly on Left Ventricular Afterload and Function in Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 19 juill 2005 [cité 25 août 2023];46(2):291-8.
311. Hachicha Z, Dumesnil JG, Pibarot P. Usefulness of the Valvuloarterial Impedance to Predict Adverse Outcome in Asymptomatic Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 8 sept 2009 [cité 25 août 2023];54(11):1003-11.
312. Hein S, Arnon E, Kostin S, Schönburg M, Elsässer A, Polyakova V, et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation*. 2003;107(7):984-91.
313. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 6 nov 2012 [cité 24 août 2023];60(19):1854-63.
314. Bishopric NH, Andreka P, Slepak T, Webster KA. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr Opin Pharmacol*. 2001;1(2):141-50.
315. Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2247-59.
316. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, et al. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest*. 1998;101(7):1326-42.
317. Marcus ML, Koyanagi S, Harrison DG, Doty DB, Hiratzka LF, Eastham CL. Abnormalities in the coronary circulation that occur as a consequence of cardiac hypertrophy. *Am J Med*. 1983;75(3):62-6.

318. Impaired coronary and myocardial flow in severe aortic stenosis is associated with increased apoptosis: a transthoracic Doppler and myocardial contrast echocardiography study [Internet]. [cité 27 août 2023].
319. Left ventricular myocardial structure in aortic valve disease before, intermediate, and late after aortic valve replacement. | *Circulation* [Internet]. [cité 27 août 2023].
320. Weber KT. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J Hypertens*. 2004;22(1):47-50.
321. Bing OH, Ngo HQ, Humphries DE, Robinson KG, Lucey EC, Carver W, et al. Localization of $\alpha 1$ (I) collagen mRNA in myocardium from the spontaneously hypertensive rat during the transition from compensated hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(9):2335-44.
322. Lindsay MM, Maxwell P, Dunn FG. TIMP-1: a marker of left ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in hypertension. *Hypertension*. 2002;40(2):136-41.
323. Increased Cardiac Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Is Related to Cardiac Fibrosis and Dysfunction in the Chronic Pressure-Overloaded Human Heart | *Circulation* [Internet]. [cité 27 août 2023].
324. Dweck MR, Joshi S, Murigu T, Alpendurada F, Jabbour A, Melina G, et al. Midwall Fibrosis Is an Independent Predictor of Mortality in Patients With Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 13 sept 2011 [cité 27 août 2023];58(12):1271-9.
325. Diastolic Heart Failure | *Circulation* [Internet]. [cité 27 août 2023]. Disponible sur: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.638569>
326. Nazarian S. Is Ventricular Arrhythmia a Possible Mediator of the Association Between Aortic Stenosis-Related Midwall Fibrosis and Mortality? *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 13 sept 2011 [cité 27 août 2023];58(12):1280-2.
327. Assomull RG, Prasad SK, Lyne J, Smith G, Burman ED, Khan M, et al. Cardiovascular Magnetic Resonance, Fibrosis, and Prognosis in Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 21 nov 2006 [cité 27 août 2023];48(10):1977-85.
328. Jin H, Lyon AR, Akar FG. Arrhythmia mechanisms in the failing heart. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2008;31(8):1048-56.
329. Föppl M, Hoffmann A, Amann FW, Roth J, Stulz P, Hasse J, et al. Sudden cardiac death after aortic valve surgery: incidence and concomitant factors. *Clin Cardiol*. 1989;12(4):202-7.
330. Ozawa T, Sugiyama S, Hayakawa M. Leukocytes biosynthesize leukotoxin (9,10-epoxy-12-octadecenoate)--a novel cytotoxic linoleate epoxide. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1989;19:164-7.
331. Juvenile hormone bisepoxide biosynthesis in vitro by the ring gland of *Drosophila melanogaster*: a putative juvenile hormone in the higher Diptera. | *PNAS* [Internet]. [cité 9 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.86.4.1421>
332. Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* [Internet]. 1 janv 2004 [cité 9 sept 2023];43(1):55-90.

333. Lipids - Wiley Online Library [Internet]. [cité 9 sept 2023]. Disponible sur: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1007/BF02533449>
334. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. | *Environmental Health Perspectives* | Vol. 105, No. suppl 4 [Internet]. [cité 9 sept 2023].
335. Newman JW, Morisseau C, Hammock BD. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res.* janv 2005;44(1):1-51.
336. Pace-Asciak CR. Hepoxilins: a review on their cellular actions. *Biochim Biophys Acta BBA - Lipids Lipid Metab* [Internet]. 17 nov 1994 [cité 9 sept 2023];1215(1):1-8.
337. Reynaud D, Demin PM, Sutherland M, Nigam S, Pace-Asciak CR. Hepoxilin signaling in intact human neutrophils: biphasic elevation of intracellular calcium by unesterified hepoxilin AQ.
338. Reynaud D, Demin P, Pace-Asciak CR. Hepoxilin A3 formation in the rat pineal gland selectively utilizes (12S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (HPETE), but not (12R)-HPETE. *J Biol Chem* [Internet]. 30 sept 1994 [cité 9 sept 2023];269(39):23976-80.
339. Craft JA, Baird S, Lament M, Burchell B. Membrane topology of epoxide hydrolase. *Biochim Biophys Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 28 août 1990;1046(1):32-9.
340. Friedberg T, Löllmann B, Becker R, Holler R, Oesch F. The microsomal epoxide hydrolase has a single membrane signal anchor sequence which is dispensable for the catalytic activity of this protein. *Biochem J.* 1 nov 1994;303 (Pt 3):967-72.
341. Bulleid NJ, Graham AB, Craft JA. Microsomal epoxide hydrolase of rat liver. Purification and characterization of enzyme fractions with different chromatographic characteristics. *Biochem J.* 15 janv 1986;233(2):607-11.
342. Decker M, Arand M, Cronin A. Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Arch Toxicol.* 1 avr 2009;83(4):297-318.
343. Enayetallah AE, French RA, Barber M, Grant DF. Cell-specific Subcellular Localization of Soluble Epoxide Hydrolase in Human Tissues. *J Histochem Cytochem.* 1 mars 2006;54(3):329-35.
344. Luo B, Norris C, Bolstad ESD, Knecht DA, Grant DF. Protein Quaternary Structure and Expression Levels Contribute to Peroxisomal-Targeting-Sequence-1-Mediated Peroxisomal Import of Human Soluble Epoxide Hydrolase. *J Mol Biol.* 27 juin 2008;380(1):31-41.
345. Mullen RT, Trelease RN, Duerk H, Arand M, Hammock BD, Oesch F, et al. Differential subcellular localization of endogenous and transfected soluble epoxide hydrolase in mammalian cells: evidence for isozyme variants. *FEBS Lett.* 1999;445(2-3):301-5.
346. Sura P, Sura R, EnayetAllah AE, Grant DF. Distribution and Expression of Soluble Epoxide Hydrolase in Human Brain. *J Histochem Cytochem.* 1 juin 2008;56(6):551-9.
347. Oesch F, Schladt L, Hartmann R, Timms C, Wörner W. Rat cytosolic epoxide hydrolase. *Adv Exp Med Biol.* 1986;197:195-201.
348. Lundgren B, Meijer J, DePierre JW. Induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases and proliferation of peroxisomes and mitochondria in mouse liver after dietary exposure to p-

- chlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. *Biochem Pharmacol*. 15 mars 1987;36(6):815-21.
349. Johansson C, Stark A, Sandberg M, Ek B, Rask L, Meijer J. Tissue specific basal expression of soluble murine epoxide hydrolase and effects of clofibrate on the mRNA levels in extrahepatic tissues and liver. *Arch Toxicol*. 1 nov 1995;70(1):61-3.
350. Kramer JS, Woltersdorf S, Duflot T, Hiesinger K, Lillich FF, Knöll F, et al. Discovery of the First in Vivo Active Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase Domain. *J Med Chem* [Internet]. 22 août 2019 [cité 19 août 2022]; Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jmedchem.9b00445>
351. Petruzzelli S, Franchi M, Gronchi L, Janni A, Oesch F, Pacifici GM, et al. Cigarette Smoke Inhibits Cytosolic but not Microsomal Epoxide Hydrolase of Human Lung. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 1 mars 1992 [cité 13 sept 2023];11(2):99-103.
352. Pinot F, Grant DF, Spearow JL, Parker AG, Hammock BD. Differential regulation of soluble epoxide hydrolase by clofibrate and sexual hormones in the liver and kidneys of mice. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 8 août 1995 [cité 9 sept 2023];50(4):501-8.
353. Denlinger CL, Vesell ES. Hormonal regulation of the developmental pattern of epoxide hydrolases: Studies in rat liver. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 15 févr 1989 [cité 9 sept 2023];38(4):603-10.
354. Le profilage de l'expression génétique du déficit en androgènes prédit une voie d'apoptose de la prostate impliquant des gènes liés au stress oxydatif | *Endocrinologie | Universitaire d'Oxford* [Internet]. [cité 9 sept 2023]. Disponible sur: <https://academic.oup.com/endo/article/143/12/4897/2880716>
355. Oesch F, Jerina DM, Daly JW. Substrate specificity of hepatic epoxide hydrase in microsomes and in a purified preparation: Evidence for homologous enzymes. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1 mai 1971 [cité 9 sept 2023];144(1):253-61.
356. Inoue N, Fujiwara K, Iwata T, Imai K, Aimoto T. Involvement of Pituitary Hormone in the Sex-Related Regulation of Hepatic Epoxide Hydrolase Activity in Mice. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 15 avr 1995 [cité 9 sept 2023];18(4):536-9.
357. Sinal CJ, Miyata M, Tohkin M, Nagata K, Bend JR, Gonzalez FJ. Targeted Disruption of Soluble Epoxide Hydrolase Reveals a Role in Blood Pressure Regulation*. *J Biol Chem* [Internet]. 22 déc 2000 [cité 9 sept 2023];275(51):40504-10.
358. Evaluation of fish models of soluble epoxide hydrolase inhibition. | *Environmental Health Perspectives* | Vol. 109, No. 1 [Internet]. [cité 9 sept 2023]. Disponible sur: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/abs/10.1289/ehp.0110961>
359. Cytosolic epoxide hydrolase in humans: development and tissue distribution | *SpringerLink* [Internet]. [cité 9 sept 2023]. Disponible sur: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00332483>
360. Beetham JK, Grant D, Arand M, Garbarino J, Kiyosue T, Pinot F, et al. Gene Evolution of Epoxide Hydrolases and Recommended Nomenclature. *DNA Cell Biol*. janv 1995;14(1):61-71.

361. Bellien J, Joannides R, Richard V, Thuillez C. Modulation of cytochrome-derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: A promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? *Pharmacol Ther* [Internet]. 1 juill 2011 [cité 10 août 2022];131(1):1-17.
362. Oni-Orisan A, Alsaleh N, Lee CR, Seubert JM. Epoxyeicosatrienoic acids and cardioprotection: the road to translation. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. sept 2014 [cité 16 août 2022];0:199-208.
363. Capdevila JH, Falck JR, Estabrook RW. Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 6 janv 1992;6(2):731-6.
364. Grapov D, Adams SH, Pedersen TL, Garvey WT, Newman JW. Type 2 diabetes associated changes in the plasma non-esterified fatty acids, oxylipins and endocannabinoids. *PLoS One*. 2012;7(11):e48852.
365. Nording ML, Yang J, Hegedus CM, Bhushan A, Kenyon NJ, Davis CE, et al. Endogenous Levels of Five Fatty Acid Metabolites in Exhaled Breath Condensate to Monitor Asthma by High-Performance Liquid Chromatography: Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *IEEE Sens J* [Internet]. 1 janv 2010 [cité 16 août 2022];10(1):123-30.
366. Moghaddam MF, Grant DF, Cheek JM, Greene JF, Williamson KC, Hammock BD. Bioactivation of leukotoxins to their toxic diols by epoxide hydrolase. *Nat Med* [Internet]. mai 1997 [cité 16 août 2022];3(5):562-6.
367. Kubota T, Arita M, Isobe Y, Iwamoto R, Goto T, Yoshioka T, et al. Eicosapentaenoic acid is converted via ω -3 epoxygenation to the anti-inflammatory metabolite 12-hydroxy-17,18-epoxyeicosatetraenoic acid. *FASEB J* [Internet]. 2014 [cité 16 août 2022];28(2):586-93. 4
368. Morin C, Sirois M, Echave V, Rizcallah E, Rousseau E. Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. janv 2009 [cité 16 août 2022];296(1):L130-9. 8
369. Falck JR, Wallukat G, Puli N, Goli M, Arnold C, Konkol A, et al. 17(R),18(S)-Epoxyeicosatetraenoic Acid, a Potent Eicosapentaenoic Acid (EPA) Derived Regulator of Cardiomyocyte Contraction: Structure–Activity Relationships and Stable Analogues. *J Med Chem* [Internet]. 23 juin 2011 [cité 16 août 2022];54(12):4109-18.
370. Kunisawa J, Arita M, Hayasaka T, Harada T, Iwamoto R, Nagasawa R, et al. Dietary ω 3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut. *Sci Rep*. 11 juin 2015;5:9750.
371. Endo T, Samokhvalov V, Darwesh AM, Khey KMW, El-Sherbeni AA, El-Kadi AOS, et al. DHA and 19,20-EDP induce lysosomal-proteolytic-dependent cytotoxicity through de novo ceramide production in H9c2 cells with a glycolytic profile. *Cell Death Discov* [Internet]. 20 août 2018 [cité 16 août 2022];4:88.
372. Zhang G, Panigrahy D, Mahakian LM, Yang J, Liu JY, Stephen Lee KS, et al. Epoxy metabolites of docosahexaenoic acid (DHA) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 16 avr 2013 [cité 16 août 2022];110(16):6530-5.
373. Ulu A, Stephen Lee KS, Miyabe C, Yang J, Hammock BG, Dong H, et al. An omega-3 epoxide of docosahexaenoic acid lowers blood pressure in angiotensin-II-dependent hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. juill 2014;64(1):87-99.

374. Les métabolites CYP époxygénase de l'acide docosahexaénoïque protègent les cellules cardiaques HL-1 contre la cytotoxicité induite par le LPS via SIRT1 | Découverte de la mort cellulaire [Internet]. [cité 16 août 2022].
375. Yang L, Mäki-Petäjä K, Cheriyan J, McEniery C, Wilkinson IB. The role of epoxyeicosatrienoic acids in the cardiovascular system. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. juill 2015 [cité 17 août 2022];80(1):28-44.
376. Brash AR. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest*. juin 2001;107(11):1339-45.
377. Imig JD, Navar LG, Roman RJ, Reddy KK, Falck JR. Actions of epoxygenase metabolites on the preglomerular vasculature. *J Am Soc Nephrol JASN*. nov 1996;7(11):2364-70.
378. Lu T, Hoshi T, Weintraub NL, Spector AA, Lee HC. Activation of ATP-sensitive K⁺ channels by epoxyeicosatrienoic acids in rat cardiac ventricular myocytes. *J Physiol* [Internet]. 15 déc 2001 [cité 17 août 2022];537(Pt 3):811-27.
379. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*. mars 1996;78(3):415-23.
380. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*. janv 2002;82(1):131-85.
381. Gebremedhin D, Ma YH, Falck JR, Roman RJ, VanRollins M, Harder DR. Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. août 1992;263(2 Pt 2):H519-525.
382. Keserü B, Barbosa-Sicard E, Popp R, Fisslthaler B, Dietrich A, Gudermann T, et al. Epoxyeicosatrienoic acids and the soluble epoxide hydrolase are determinants of pulmonary artery pressure and the acute hypoxic pulmonary vasoconstrictor response. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. déc 2008;22(12):4306-15.
383. Pokreisz P, Fleming I, Kiss L, Barbosa-Sicard E, Fisslthaler B, Falck JR, et al. Cytochrome P450 epoxygenase gene function in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary vascular remodeling. *Hypertens Dallas Tex* 1979. avr 2006;47(4):762-70.
384. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*. 30 sept 1999;401(6752):493-7.
385. Pi L, Dx Z, Zd G, Wb C. Role of ADP-ribose in 11,12-EET-induced activation of K(Ca) channels in coronary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. avr 2002 [cité 15 août 2022];282(4).
386. Node K, Ruan XL, Dai J, Yang SX, Graham L, Zeldin DC, et al. Activation of Galpha s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem*. 11 mai 2001;276(19):15983-9.
387. Imig JD. Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*. sept 2005;289(3):F496-503.
388. Yan G, Chen S, You B, Sun J. Activation of sphingosine kinase-1 mediates induction of endothelial cell proliferation and angiogenesis by epoxyeicosatrienoic acids. *Cardiovasc Res*. 1 mai 2008;78(2):308-14.

389. Imig JD. 20-HETE or EETs: which arachidonic acid metabolite regulates proximal tubule transporters and contributes to pressure natriuresis? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. juill 2004;287(1):R3-5.
390. Imig JD, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat Rev Drug Discov*. oct 2009;8(10):794-805.
391. Duflot T, Roche C, Lamoureux F, Guerrot D, Bellien J. Design and discovery of soluble epoxide hydrolase inhibitors for the treatment of cardiovascular diseases. *Expert Opin Drug Discov [Internet]*. mars 2014 [cité 10 août 2022];9(3):229-43.
392. Kim IH, Morisseau C, Watanabe T, Hammock BD. Design, synthesis, and biological activity of 1,3-disubstituted ureas as potent inhibitors of the soluble epoxide hydrolase of increased water solubility. *J Med Chem*. 8 avr 2004;47(8):2110-22.
393. Morisseau C, Goodrow MH, Dowdy D, Zheng J, Greene JF, Sanborn JR, et al. Potent urea and carbamate inhibitors of soluble epoxide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 3 août 1999 [cité 10 août 2022];96(16):8849-54.
394. docksci.com [Internet]. [cité 10 août 2022]. Inhibition of cytosolic epoxide hydrolase by trans-3-phenylglycidols. - PDF Download Free. Disponible sur: https://docksci.com/inhibition-of-cytosolic-epoxide-hydrolase-by-trans-3-phenylglycidols_5f00d823097c47aa258b4570.html
395. Liu JY, Tsai HJ, Hwang SH, Jones PD, Morisseau C, Hammock BD. Pharmacokinetic optimization of four soluble epoxide hydrolase inhibitors for use in a murine model of inflammation. *Br J Pharmacol [Internet]*. 2009 [cité 10 août 2022];156(2):284-96.
396. Roche C, Besnier M, Cassel R, Harouki N, Coquerel D, Guerrot D, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition improves coronary endothelial function and prevents the development of cardiac alterations in obese insulin-resistant mice. *AJP - Heart Circ Physiol [Internet]*. 2015 [cité 17 août 2022];308(9):1020-9.
397. Hashimoto K. Role of Soluble Epoxide Hydrolase in Metabolism of PUFAs in Psychiatric and Neurological Disorders. *Front Pharmacol [Internet]*. 30 janv 2019 [cité 9 sept 2023];10:36.
398. Varennes O, Mentaverri R, Duflot T, Kauffenstein G, Objois T, Lenglet G, et al. The Metabolism of Epoxyeicosatrienoic Acids by Soluble Epoxide Hydrolase Is Protective against the Development of Vascular Calcification. *Int J Mol Sci*. 17 juin 2020;21(12):4313.
399. Newman JW, Morisseau C, Harris TR, Hammock BD. The soluble epoxide hydrolase encoded by EPXH2 is a bifunctional enzyme with novel lipid phosphate phosphatase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 févr 2003;100(4):1558-63.
400. Sonou T, Ohya M, Yashiro M, Masumoto A, Nakashima Y, Ito T, et al. Mineral Composition of Phosphate-Induced Calcification in a Rat Aortic Tissue Culture Model. *J Atheroscler Thromb*. 2015;22(11):1197-206.
401. Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Migration by Cytochrome P450 Epoxygenase-Derived Eicosanoids | *Circulation Research [Internet]*. [cité 19 sept 2023].
402. Cronin A, Mowbray S, Dürk H, Homburg S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. The N-terminal domain of mammalian soluble epoxide hydrolase is a phosphatase. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 18 févr 2003 [cité 16 avr 2022];100(4):1552-7.

403. Allen KN, Dunaway-Mariano D. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 1 sept 2004 [cité 17 août 2022];29(9):495-503.
404. Enayetallah AE, Grant DF. Effects of human soluble epoxide hydrolase polymorphisms on isoprenoid phosphate hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 3 mars 2006 [cité 17 août 2022];341(1):254-60.
405. Cronin A, Homburg S, Dürk H, Richter I, Adamska M, Frère F, et al. Insights into the Catalytic Mechanism of Human sEH Phosphatase by Site-Directed Mutagenesis and LC-MS/MS Analysis. *J Mol Biol* [Internet]. 14 nov 2008 [cité 17 août 2022];383(3):627-40.
406. Proton Shuttles and Phosphatase Activity in Soluble Epoxide Hydrolase | *Journal of the American Chemical Society* [Internet]. [cité 17 août 2022]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja066150c>
407. Gomez GA, Morisseau C, Hammock BD, Christianson DW. Structure of Human Epoxide Hydrolase Reveals Mechanistic Inferences on Bifunctional Catalysis in Epoxide and Phosphate Ester Hydrolysis. *Biochemistry* [Internet]. 1 avr 2004 [cité 10 août 2022];43(16):4716-23. j
408. Oguro A, Sakamoto K, Suzuki S, Imaoka S. Contribution of hydrolase and phosphatase domains in soluble epoxide hydrolase to vascular endothelial growth factor expression and cell growth. *Biol Pharm Bull.* déc 2009;32(12):1962-7.
409. Goetzl EJ, An S. Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* déc 1998;12(15):1589-98.
410. Oguro A, Imaoka S. Lysophosphatidic acids are new substrates for the phosphatase domain of soluble epoxide hydrolase. *J Lipid Res.* mars 2012;53(3):505-12.
411. Kramer J, Proschak E. Phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* [Internet]. 1 nov 2017 [cité 9 sept 2023];133:88-92.
412. Spiegel S, Milstien S. Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives. *J Biol Chem.* 26 janv 2007;282(4):2125-9.
413. Ghazaly EA, Miraki-Moud F, Smith P, Gnanaranjan C, Koniali L, Oke A, et al. Repression of sphingosine kinase (SK)-interacting protein (SKIP) in acute myeloid leukemia diminishes SK activity and its re-expression restores SK function. *J Biol Chem* [Internet]. 17 avr 2020 [cité 18 août 2022];295(16):5496-508.
414. Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. juin 2011 [cité 18 août 2022];11(6):403-15.
415. English D, Welch Z, Kovala AT, Harvey K, Volpert OV, Brindley DN, et al. Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* nov 2000;14(14):2255-65.
416. Kribii R, Soustre I, Karst F. Biosynthèse des isoprénoïdes. *Acta Bot Gallica* [Internet]. janv 1999 [cité 18 août 2022];146(1):5-24.

417. Tran KL, Aronov PA, Tanaka H, Newman JW, Hammock BD, Morisseau C. Lipid sulfates and sulfonates are allosteric competitive inhibitors of the N-terminal phosphatase activity of the mammalian soluble epoxide hydrolase. *Biochemistry*. 13 sept 2005;44(36):12179-87.
418. Saulnier-Blache JS. [Lysophosphatidic acid: a « bioactive » phospholipid]. *Med Sci MS*. sept 2004;20(8-9):799-803.
419. Vogt W. Pharmacologically active acidic phospholipids and glycolipids. *Biochem Pharmacol [Internet]*. 1 avr 1963 [cité 19 août 2022];12(4):415-20.
420. Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res*. juill 2014;55(7):1192-214.
421. Aoki J, Inoue A, Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids [Internet]*. 1 sept 2008 [cité 19 août 2022];1781(9):513-8.
422. Smyth SS, Cheng HY, Miriyala S, Panchatcharam M, Morris AJ. Roles of Lysophosphatidic Acid in Cardiovascular Physiology and Disease. *Biochim Biophys Acta [Internet]*. sept 2008 [cité 19 août 2022];1781(9):563-70.
423. Bhattarai S, Sharma S, Subedi U, Ara H, Shum A, Milena M, et al. The ATX–LPA Axis Regulates Vascular Permeability during Cerebral Ischemic-Reperfusion. *Int J Mol Sci [Internet]*. janv 2022 [cité 19 août 2022];23(8):4138.
424. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, et al. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 janv 2003;100(1):131-6.
425. Morisseau C, Sahdeo S, Cortopassi G, Hammock BD. Development of an HTS assay for EPHX2 phosphatase activity and screening of non-targeted libraries. *Anal Biochem [Internet]*. 1 mars 2013 [cité 19 août 2022];434(1):105-11.
426. Hou HH, Liao YJ, Hsiao SH, Shyue SK, Lee TS. Role of phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase in regulating simvastatin-activated endothelial nitric oxide synthase. *Sci Rep [Internet]*. 25 août 2015 [cité 21 août 2022];5(1):13524.
427. Matsumoto N, Suzuki E, Ishikawa M, Shirafuji T, Hasumi K. Soluble Epoxide Hydrolase as an Anti-inflammatory Target of the Thrombolytic Stroke Drug SMTP-7. *J Biol Chem [Internet]*. 26 déc 2014 [cité 8 févr 2023];289(52):35826-38.
428. Klingler FM, Wolf M, Wittmann S, Gribbon P, Proschak E. Bacterial Expression and HTS Assessment of Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase. *SLAS Discov [Internet]*. 1 août 2016 [cité 19 août 2022];21(7):689-94.
429. Argiriadi MA, Morisseau C, Hammock BD, Christianson DW. Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: Structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 14 sept 1999 [cité 4 mai 2022];96(19):10637-42.
430. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:175-95.

431. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* juin 2008;10(6):1115-26.
432. Youn JY, Wang T, Cai H. An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production. *Circ Res.* 2 janv 2009;104(1):50-9.
433. Hercule HC, Schunck WH, Gross V, Seringer J, Leung FP, Weldon SM, et al. Interaction between P450 eicosanoids and nitric oxide in the control of arterial tone in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* janv 2009;29(1):54-60.
434. Michell BJ, Chen Zp null, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 25 mai 2001;276(21):17625-8.
435. Hou HH, Hammock BD, Su KH, Morisseau C, Kou YR, Imaoka S, et al. N-terminal domain of soluble epoxide hydrolase negatively regulates the VEGF-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res [Internet].* 1 janv 2012 [cité 21 août 2022];93(1):120.
436. Mölgaard J, von Schenck H, Olsson AG. Effects of simvastatin on plasma lipid, lipoprotein and apolipoprotein concentrations in hypercholesterolaemia. *Eur Heart J.* mai 1988;9(5):541-51.
437. Jones SP, Lefer DJ. Cardioprotective actions of acute HMG-CoA reductase inhibition in the setting of myocardial infarction. *Acta Physiol Scand.* sept 2001;173(1):139-43.
438. Gotto AM, Farmer JA. Pleiotropic effects of statins: do they matter? *Curr Opin Lipidol.* août 2001;12(4):391-4.
439. Effets de la simvastatine sur la fibrose pulmonaire, l'hypertension pulmonaire et la capacité d'exercice chez les rats traités à la bléomycine - Schroll - 2013 - *Acta Physiologica - Wiley Online Library [Internet].* [cité 21 août 2022].
440. EnayetAllah AE, Luria A, Luo B, Tsai HJ, Sura P, Hammock BD, et al. Opposite Regulation of Cholesterol Levels by the Phosphatase and Hydrolase Domains of Soluble Epoxide Hydrolase. *J Biol Chem [Internet].* 26 déc 2008 [cité 11 août 2022];283(52):36592-8.
441. Lien CC, Chen CH, Lee YM, Guo BC, Cheng LC, Pan CC, et al. The phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase regulates ATP-binding cassette transporter-A1-dependent cholesterol efflux. *J Cell Mol Med [Internet].* 2019 [cité 22 août 2022];23(10):6611-21.
442. Maguire EM, Pearce SWA, Xiao Q. Foam cell formation: A new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol.* janv 2019;112:54-71.
443. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med.* janv 2016;20(1):17-28.
444. Liu F, Diao X, Cong H, Suzuki E, Hasumi K, Takeshima H. Soluble epoxide hydrolase maintains steady-state lipid turnover linked with autocrine signaling in peritoneal macrophages. *iScience [Internet].* 18 août 2023 [cité 13 sept 2023];26(8):107465.
445. Arand M, Grant DF, Beetham JK, Friedberg T, Oesch F, Hammock BD. Sequence similarity of mammalian epoxide hydrolases to the bacterial haloalkane dehalogenase and other related

proteins: Implication for the potential catalytic mechanism of enzymatic epoxide hydrolysis. *FEBS Lett.* 7 févr 1994;338(3):251-6.

446. Sandberg M, Meijer J. Structural Characterization of the Human Soluble Epoxide Hydrolase Gene (EPHX2). *Biochem Biophys Res Commun.* 16 avr 1996;221(2):333-9.
447. Hennebold JD, Mah K, Perez W, Vance JE, Stouffer RL, Morisseau C, et al. Identification and Characterization of an Ovary-Selective Isoform of Epoxide Hydrolase1. *Biol Reprod.* 1 avr 2005;72(4):968-75.
448. Shkolnik K, Ben-Dor S, Galiani D, Hourvitz A, Dekel N. A novel ovary-specific and ovulation-associated variant of epoxide hydrolase 2. *FEBS Lett.* 2007;581(25):4891-8.
449. Beetham JK, Tian TG, Hammock BD. cDNA Cloning and Expression of a Soluble Epoxide Hydrolase from Human Liver. *Arch Biochem Biophys.* 15 août 1993;305(1):197-201.
450. Raaka S, Hassett C, Omiencinski CJ. Human microsomal epoxide hydrolase: 5'-flanking region genetic polymorphisms. *Carcinogenesis.* mars 1998;19(3):387-93.
451. Figer A, Friedman T, Manguoglu AE, Flex D, Vazina A, Novikov I, et al. Analysis of polymorphic patterns in candidate genes in Israeli patients with prostate cancer. *Isr Med Assoc J IMAJ.* oct 2003;5(10):741-5.
452. Roumeliotis S, Roumeliotis A, Stamou A, Panagoutsos S, Manolopoulos VG, Tsetsos F, et al. Association of rs11780592 Polymorphism in the Human Soluble Epoxide Hydrolase Gene (EPHX2) with Oxidized LDL and Mortality in Patients with Diabetic Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:8817502.
453. Srivastava PK, Sharma VK, Kalonia DS, Grant DF. Polymorphisms in human soluble epoxide hydrolase: effects on enzyme activity, enzyme stability, and quaternary structure. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 15 juill 2004 [cité 10 août 2022];427(2):164-9.
454. Zordoky BNM, El-Kadi AOS. Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther.* mars 2010;125(3):446-63.
455. Przybyla-Zawislak BD, Srivastava PK, Vazquez-Matias J, Mohrenweiser HW, Maxwell JE, Hammock BD, et al. Polymorphisms in human soluble epoxide hydrolase. *Mol Pharmacol.* août 2003;64(2):482-90.
456. Norris KK, DeAngelo TM, Vesell ES. Genetic and environmental factors that regulate cytosolic epoxide hydrolase activity in normal human lymphocytes. *J Clin Invest* [Internet]. déc 1989 [cité 10 août 2022];84(6):1749-56.
457. Marciante KD, Totah RA, Heckbert SR, Smith NL, Lemaitre RN, Lumley T, et al. Common variation in cytochrome P450 epoxygenase genes and the risk of incident nonfatal myocardial infarction and ischemic stroke. *Pharmacogenet Genomics.* juin 2008;18(6):535-43.
458. King LM, Gainer JV, David GL, Dai D, Goldstein JA, Brown NJ, et al. Single nucleotide polymorphisms in the CYP2J2 and CYP2C8 genes and the risk of hypertension. *Pharmacogenet Genomics.* janv 2005;15(1):7-13.

459. Dreisbach AW, Japa S, Sigel A, Parenti MB, Hess AE, Srinouanprachanh SL, et al. The Prevalence of CYP2C8, 2C9, 2J2, and soluble epoxide hydrolase polymorphisms in African Americans with hypertension. *Am J Hypertens*. oct 2005;18(10):1276-81.
460. Lee CR, Pretorius M, Schuck RN, Burch LH, Bartlett J, Williams SM, et al. Genetic Variation in Soluble Epoxide Hydrolase (EPHX2) Is Associated With Forearm Vasodilator Responses in Humans. *Hypertension* [Internet]. janv 2011 [cité 11 août 2022];57(1):116-22.
461. Fornage M, Boerwinkle E, Doris PA, Jacobs D, Liu K, Wong ND. Polymorphism of the soluble epoxide hydrolase is associated with coronary artery calcification in African-American subjects: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Circulation*. 27 janv 2004;109(3):335-9.
462. Wei Q, Doris PA, Pollizotto MV, Boerwinkle E, Jacobs DR, Siscovick DS, et al. Sequence variation in the soluble epoxide hydrolase gene and subclinical coronary atherosclerosis: interaction with cigarette smoking. *Atherosclerosis*. janv 2007;190(1):26-34.
463. Burdon KP, Lehtinen AB, Langefeld CD, Carr JJ, Rich SS, Freedman BI, et al. Genetic analysis of the soluble epoxide hydrolase gene, EPHX2, in subclinical cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study. *Diab Vasc Dis Res* [Internet]. 1 juin 2008 [cité 18 avr 2022];5(2):128-34. Disponible sur: <https://doi.org/10.3132/dvdr.2008.021>
464. Schibler D, Russell RG, Fleisch H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin Sci*. oct 1968;35(2):363-72.
465. O'Neill WC, Lomashvili KA, Malluche HH, Faugere MC, Riser BL. Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int*. mars 2011;79(5):512-7.
466. Leuillier M, Duflot T, Ménoret S, Messaoudi H, Djerada Z, Groussard D, et al. CRISPR/Cas9-mediated inactivation of the phosphatase activity of soluble epoxide hydrolase prevents obesity and cardiac ischemic injury. *J Adv Res*. janv 2023;43:163-74.
467. Woldt E, Terrand J, Mlih M, Matz RL, Bruban V, Coudane F, et al. The nuclear hormone receptor PPAR γ counteracts vascular calcification by inhibiting Wnt5a signalling in vascular smooth muscle cells. *Nat Commun*. 2012;3:1077.
468. Reinhold S, Blankesteyn WM, Foulquier S. The Interplay of WNT and PPAR γ Signaling in Vascular Calcification. *Cells*. 10 déc 2020;9(12):2658.
469. Frontiers | Pyrophosphate and Irreversibility in Evolution, or why PPI Is Not an Energy Currency and why Nature Chose Triphosphates [Internet]. [cité 18 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.759359/full>
470. Geraldo LHM, Spohr TCL de S, Amaral RF do, Fonseca ACC da, Garcia C, Mendes F de A, et al. Role of lysophosphatidic acid and its receptors in health and disease: novel therapeutic strategies. *Signal Transduct Target Ther*. 1 févr 2021;6(1):45.
471. He W, Huang J, Liu Y, Xie C, Zhang K, Zhu X, et al. Deletion of soluble epoxide hydrolase suppressed chronic kidney disease-related vascular calcification by restoring Sirtuin 3 expression. *Cell Death Dis* [Internet]. 23 oct 2021 [cité 18 sept 2023];12(11):992.
472. Marwick TH, Amann K, Bangalore S, Cavalcante JL, Charytan DM, Craig JC, et al. Chronic kidney disease and valvular heart disease: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global

- Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* [Internet]. 1 oct 2019 [cité 20 sept 2023];96(4):836-49.
473. Shroff GR, Bangalore S, Bhave NM, Chang TI, Garcia S, Mathew RO, et al. Evaluation and Management of Aortic Stenosis in Chronic Kidney Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 22 juin 2021;143(25):e1088-114.
474. Wang L, Tang R, Zhang Y, Liu Z, Chen S, Song K, et al. A Rat Model with Multivalve Calcification Induced by Subtotal Nephrectomy and High-Phosphorus Diet. *Kidney Dis Basel Switz*. sept 2020;6(5):346-54.
475. Mary A, Objois T, Brazier M, Bennis Y, Boudot C, Lenglet G, et al. Decreased monocyte calcium sensing receptor expression in patients with chronic kidney disease is associated with impaired monocyte ability to reduce vascular calcification. *Kidney Int*. juin 2021;99(6):1382-91.
476. IJMS | Free Full-Text | Functional Regulation of PPARs through Post-Translational Modifications [Internet]. [cité 21 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1738>
477. Thomas G, Drawz PE. BP Measurement Techniques. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* [Internet]. 6 juill 2018 [cité 21 sept 2023];13(7):1124-31.
478. Gao J, Bellien J, Gomez E, Henry JP, Dautreux B, Bounoure F, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition prevents coronary endothelial dysfunction in mice with renovascular hypertension. *J Hypertens* [Internet]. juin 2011 [cité 21 sept 2023];29(6):1128.
479. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Lowers Arterial Blood Pressure in Angiotensin II Hypertension | Hypertension [Internet]. [cité 21 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/hy0202.103788>
480. L'augmentation ou la stabilisation de la production rénale d'acide époxyeicosatriénoïque atténue la fonction rénale anormale et l'hypertension chez les rats obèses | Journal américain de physiologie-physiologie rénale [Internet]. [cité 21 sept 2023]. Disponible sur: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajprenal.00004.2007>

