

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE ET PHARMACIE

ECOLE DOCTORALE
Biologie Santé Nantes-Angers

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**Implication de la triade OPG/RANK/RANKL
en physiopathologie vasculaire :
à propos d'une étude comparée
entre plaques athéromateuses carotidiennes et fémorales**

THESE DE DOCTORAT

**Biologie – Médecine – Santé
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

*présentée
et soutenue publiquement par*

Marie-Françoise HEYMANN
Née Gautreau-Mafayout

le 24 octobre 2011, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs

Mr MEILHAC Olivier

Directeur de recherche, INSERM U698, Paris

Mr de PINIEUX Gonzague

Professeur des universités-Praticien Hospitalier, CHU Tours

Examineurs

Mme IMBERT Berthe-Marie

Professeur des universités, Faculté Pharmacie, Nantes

Mr BOHIC Sylvain

Chargé de recherche, INSERM U836, Grenoble

Mr GOUEFFIC Yann

Maitre de conférences des universités-Praticien Hospitalier, CHU Nantes

Directeur de thèse

Mr PASSUTI Norbert

Professeur des universités-Praticien Hospitalier, CHU Nantes

Table des matières

Implication de la triade OPG/RANK/RANKL en physiopathologie vasculaire : à propos d'une étude comparée entre plaques athéromateuses carotidiennes et fémorales	1
Remerciements	Erreur ! Signet non défini.
Liste des abréviations	3
Introduction	5
I. La triade OPG/ RANK/ RANKL	10
1) OPG	10
2) RANKL	16
3) RANK	20
II. Implication de la triade OPG/RANK/RANKL en pathologie vasculaire	24
III. Triade et calcifications artérielles	27
1) Les calcifications vasculaires	27
2) Mécanismes moléculaires de la calcification artérielle dans l'athérosclérose	29
a) Rappels sur l'ostéogenèse	29
b) Modèles de minéralisation artérielle	33
c) Molécules impliquées dans la calcification artérielle	35
IV. Objectifs de la thèse	42
Partie I : Athérosclérose et calcifications artérielles	44
I. Introduction :	45
1. Rappel histologique	45
2. Athérome : une maladie inflammatoire	46
a) Quelques définitions	46
b) Histoire naturelle de la plaque	46
c) Physiopathologie	48
d) Notion de plaque instable	50
3. Artériopathie périphérique et athérome	51
4. Projet ECLA : Etude Comparative des Lésions Athéromateuses	51
II. Article 1	53
III. Discussion	55
Partie II : Triade et calcifications artérielles	58
I. Introduction	59
1. Le mastocyte	59
a) Rôle dans la dysfonction endothéliale	60
b) Rôle dans l'accumulation de lipides	60
c) Les mastocytes interviennent également dans la vulnérabilité de la plaque	61
d) Rôle dans la calcification de la plaque	61
2. Les cellules de la lignée monocyttaire : monocyte, macrophage, cellule dendritique ..	62
a) Adhérence leucocytaire	63
b) Les macrophages donnent naissance aux cellules spumeuses	63
c) Les macrophages induisent à la fois l'apoptose et la migration des cellules musculaires lisses	63
3. Les lymphocytes	66
a) La réponse Th1	66
b) La réponse Th2	67

c) La réponse T régulatrice	67
d) La réponse immune humorale.....	67
II. Article 2.....	69
III. Discussion	85
Discussion générale et conclusions	91
Annexes.....	99
Bibliographie.....	101

Liste des abréviations

ALP : ALkaline Phosphatase
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
CML : Cellule Musculaire Lisse
CRP : C-Reactive Protein
CSF : Colony Stimulating Factor
CVC : Calcifying Vascular Cell
DBP : vitamin D Binding Protein
ECLA : Etude Comparative des Lésions Athéromateuses
FD CR-1 : Follicular Dendritic Cell-derived Receptor-1
HES : Hémalum Eosine Safran
HPG : héparine protéoglycane
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1
IL : Interleukin
INF : Interféron
LDL : Low Density Lipoprotein
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant protein-1
M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor
MIF : Macrophage Inhibitory Factor
MMP : Matrix MetalloProtease
M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor
OCIF : Osteoclastogenesis Inhibitory Factor
ODF : Osteoclast Differentiation Factor
OPG : Osteoprotegerin
OPGL : Osteoprotegerin Ligand
OPN : Osteopontin
PGE2 : prostaglandine E2
PTH : ParaThyroidHormone
RANK : Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B
RANKL : Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2
TCG : tumeur à cellules géantes
TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFRSF: TNF Receptor SuperFamily

TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TRANCE : TNF-Related Activation-Induced Cytokine

TR-1 : TNF Receptor-like molecule 1

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction

Le tissu osseux est un tissu de soutien qui est sujet à un renouvellement permanent appelé remodelage osseux. Ce remodelage est un processus complexe qui fait intervenir deux activités opposées mais complémentaires, conduisant au maintien de la masse osseuse : la formation du tissu osseux par les ostéoblastes et sa destruction par les ostéoclastes. Ce mécanisme permet au tissu osseux de remplir son rôle métabolique (libération de sels minéraux lors de la résorption et contrôle de l'homéostasie phosphocalcique) et son rôle de soutien (adaptations architecturales aux contraintes mécaniques). Les signaux qui déclenchent le remodelage osseux sont de nature diverse et incluent des signaux mécaniques (altération de l'architecture locale de l'os : fracture, prise de poids...) (Turner et *al* 1998) ou hormonale comme c'est le cas dans l'ostéoporose où une diminution du taux d'œstrogène entraîne une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes altérant en retour l'activité ostéoblastique (Pacifci et *al* 1998).

Le remodelage en lui-même présente une succession de quatre phases parfaitement définies : l'activation, la résorption, l'inversion et la formation (Hill et *al* 1998) (figure 1). A l'état quiescent, la surface des travées osseuses est recouverte par une bordure de cellules planiformes appelées cellules bordantes, qui empêchent l'accès de la matrice extracellulaire minéralisée aux ostéoclastes. Ces cellules bordantes ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires. Lors de la phase d'activation, sous l'action des facteurs cytokiniques et/ou hormonaux (PTH, vitamine D3, prostaglandine E2 (PGE2), BMP, etc...), les ostéoblastes associés entre eux par l'intermédiaire de jonctions communicantes se rétractent et permettent ainsi l'accès de la surface minéralisée aux précurseurs mononucléés des ostéoclastes, ou pré-ostéoclastes, qui fusionnent avant d'adhérer à cette surface osseuse minéralisée. Les ostéoblastes activés vont favoriser leur différenciation en ostéoclastes matures via la production de différentes cytokines dont RANKL qui va interagir avec son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes.

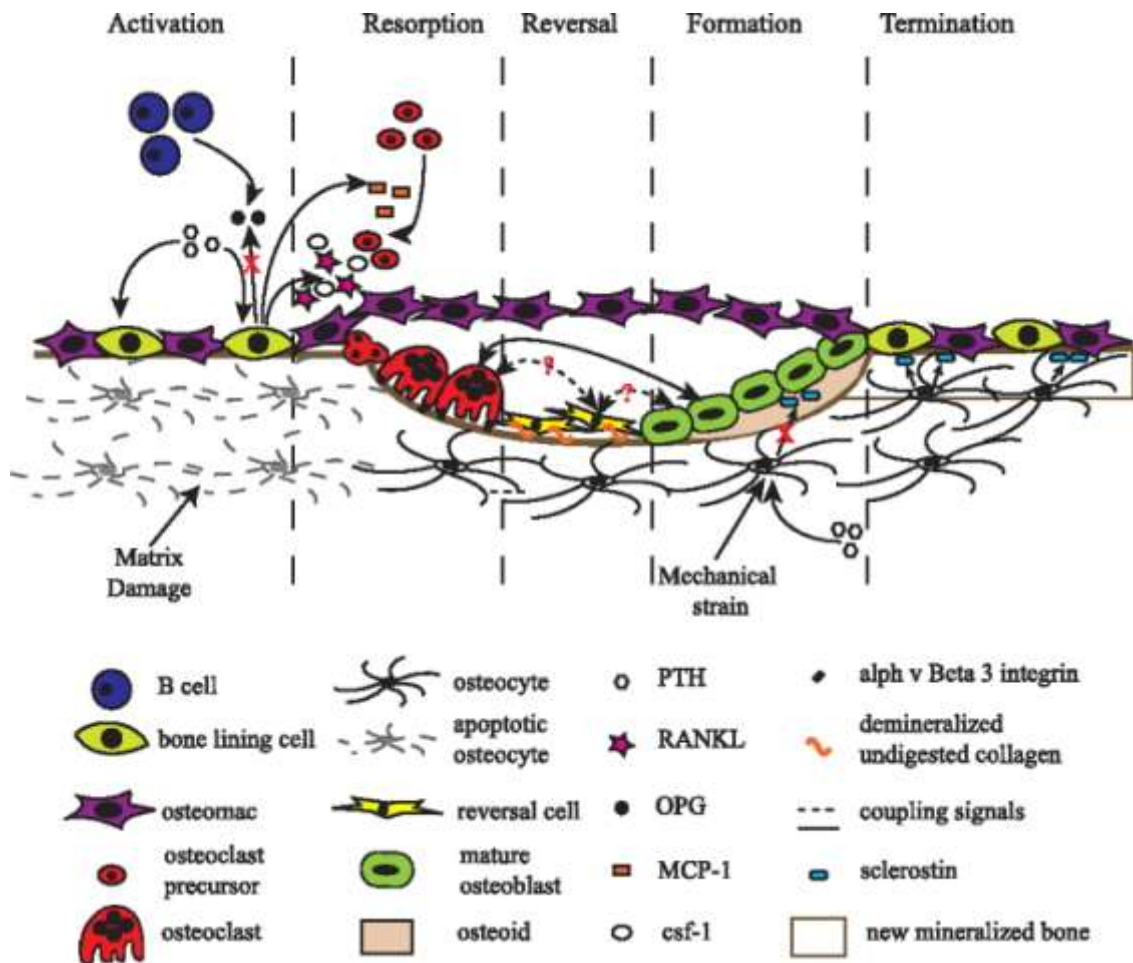


Figure 1 : Représentation schématique du processus de remodelage osseux (Raggatt LJ et al 2010). Le remodelage osseux résulte des communications entre ostéoclastes responsables de la dégradation des matrices extracellulaires organiques et minérales du tissu osseux par un processus de résorption osseuse, et les ostéoblastes qui assurent la synthèse d'une matrice collagénique appelée ostéoïde qui se minéralisera dans un second temps (phénomène d'apposition osseuse). De nombreux médiateurs contrôlent ce processus dont le triade moléculaire OPG/RANK/RANKL.

Une fois les ostéoclastes formés et matures, la phase de résorption débute. Les ostéoclastes résorbent la matrice extracellulaire minéralisée en libérant de nombreuses enzymes en particulier la cathepsine K, une cystéine protéase qui contribue à la digestion de la matrice organique et par la libération active en regard de la surface minéralisée (au niveau de la bordure en brosse) de protons qui acidifient le microenvironnement et induisent la solubilisation de la phase minérale (Rousselle et al 2002). Les facteurs responsables de l'arrêt d'activité des ostéoclastes ne sont pas totalement élucidés. Il semblerait toutefois que des récepteurs membranaires sensibles à la concentration de calcium dans la chambre de résorption provoqueraient le détachement des ostéoclastes de la surface osseuse (Marie et al 2010). Les ostéoclastes ainsi détachés peuvent se déplacer à la surface de l'os et résorber de

nouveau la matrice osseuse ou mourir par apoptose vraisemblablement médiée par le système Fas/Fas ligand (Wu et *al* 2003). Le processus de migration ostéoclastique fait intervenir la libération de métalloprotéinases matricielles comme la MMP9 et une déficience en MMP9 est associée à une activité ostéoclastique réduite. Suite à l'arrêt de la phase de résorption, débute la phase d'inversion pendant laquelle les ostéoclastes sont remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune et préparer le lit de l'apposition. L'ultime phase de ce cycle est donc la phase de formation osseuse. Elle est caractérisée par le recrutement des ostéoblastes au fond de la lacune de résorption qu'ils comblent en apposant une nouvelle matrice collagénique non minéralisée (ou ostéoïde) qui sera secondairement minéralisée.

La maturation et l'activité ostéoclastiques/ostéoblastiques sont donc sous la dépendance de facteurs locaux et systémiques (hormones, facteurs de croissance, cytokines,...). Parmi ces facteurs, la triade OPG / RANK / RANKL, découverte il y a une dizaine d'années, apparaît être la voie principale de régulation du couplage ostéoblastes-ostéoclastes et du contrôle de la résorption osseuse. La découverte de l'ostéoprotégérine ou OPG en 1997, puis de la mise en évidence de RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B) et de son ligand RANKL a révolutionné la communauté scientifique s'intéressant au tissu minéralisé par l'identification d'effecteurs terminaux de la différenciation ostéoclastique. Les membres de cette triade moléculaire font partie de la superfamille du Tumor Necrosis Factor (TNFSF) et de ses récepteurs (TNFRSF). L'interaction de RANKL et de son récepteur RANK induit la différenciation et l'activation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures et accroît également leur survie (Figure 2). L'OPG est un récepteur leurre qui existe sous une forme soluble capable de se lier à RANKL, bloquant ainsi son interaction avec RANK. L'OPG agit donc comme un compétiteur de la liaison RANK-RANKL. La dérégulation de cette triade moléculaire est responsable du développement de processus ostéolytiques ou d'ostéocondensation associés à des pathologies systémiques ou localisées, tumorales ou bénignes.

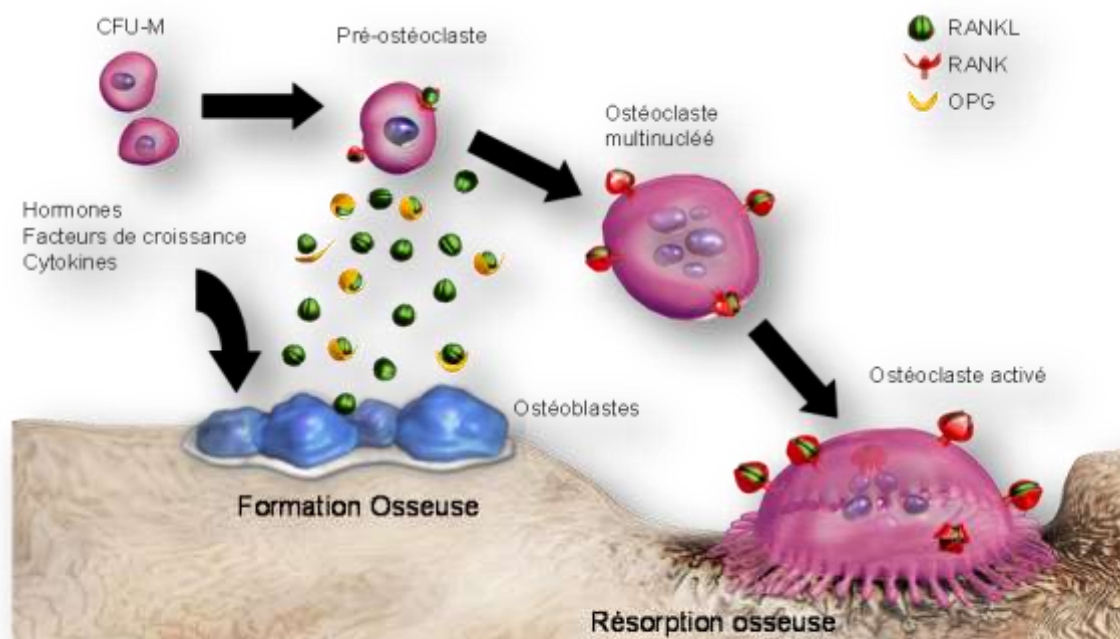


Figure 2 : Rôle de la triade OPG/RANK/RANKL dans la différenciation ostéoclastique

(d'après Amgen adapté de Boyle et al 2003). RANKL synthétisé par les ostéoblastes se fixe sur son récepteur RANK exprimé par les précurseurs ostéoclastiques et induit leur différenciation en ostéoclastes. L'OPG produit par l'ostéoblaste, en se liant à RANKL inhibe l'interaction RANKL/RANK et inhibe ainsi la différenciation ostéoclastique. RANKL est donc un puissant agent pro-résorptif et l'OPG est une puissante molécule anti-résorptive.

L'utilisation de modèles animaux modifiés génétiquement (cf paragraphe I) a permis de mieux comprendre le rôle de chacune de ces molécules dans le contrôle de la biologie ostéoarticulaire, immunitaire et vasculaire, domaine qui va nous intéresser plus spécifiquement. La notion d'axe métabolisme osseux-calcifications vasculaires (Bone Vascular Axis) unissant métabolismes osseux et artériel est née de l'observation de changements simultanés et réciproques entre les deux tissus. L'influence des cytokines inflammatoires conduit à l'apparition de calcifications vasculaires tout en inhibant la minéralisation osseuse (Demer et al 2008, Parhami et al 1997). Certains agents ostéo-inducteurs, telles que l'hormone parathyroïdienne (PTH) et la protéine BMP-7, sont à la fois des promoteurs de la minéralisation osseuse et des inhibiteurs de la minéralisation au niveau des artères (Demer et al 2008, Shao et al 2005). Autre fait, la matrice osseuse est riche en facteurs de régulation qui sont aussi présents et actifs dans les artères. Lors de la résorption osseuse, ces facteurs sont libérés dans la circulation et pourraient donc agir au niveau du système artériel. La clinique confirme cet axe «ostéo-vasculaire». En effet, des calcifications vasculaires sont observées au cours de l'ostéoporose, indépendamment de l'âge. Ostéoporose

et calcifications vasculaires partagent de nombreux facteurs de risque : vieillissement, déficit en œstrogènes, dyslipidémie, anomalies des taux de vitamines D et K, hyperparathyroïdisme, hyperhomocystéinémie, inflammation chronique, stress oxydatif (Abedin M et *al* 2004, Demer et *al* 2008, Farhat GN et *al* 2006). On sait désormais que les biphosphonates, donnés dans le traitement de l'ostéoporose, agissent directement au niveau des artères (inhibition des calcifications) indépendamment de leur action sur l'os (inhibition de la résorption osseuse). (Demer et *al* 2008, Price PA et *al* 2001). Une régulation par des facteurs communs aux deux tissus peut donc être légitimement envisagée. Dans ce contexte, le rôle de la triade OPG, RANK ligand et RANK, qui régule la résorption et par voie de conséquence la minéralisation osseuse, et qui est active également dans la paroi des vaisseaux, est un ensemble moléculaire privilégié faisant le lien entre les systèmes ostéoarticulaire et vasculaire. Ces différents éléments nous ont amené à nous intéresser de plus près à cette triade moléculaire et à son rôle dans le développement des calcifications vasculaires.

I. La triade OPG/ RANK/ RANKL

1) OPG

L'ostéoprotégérine ou OPG a été découverte en 1997 par deux équipes indépendantes cherchant à identifier des molécules de la famille du TNF ayant une activité anti-résorption osseuse (Simonet et *al* 1997, Yasuda et *al* 1998). C'est une glycoprotéine sécrétée appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (TNFRSF11B).

Ses premières mises en évidence lui ont valu l'attribution de différents acronymes :

- FDCR-1 : Follicular Dendritic Cell-derived Receptor-1 (Yun et *al* 1998)
- OCIF : Osteoclastogenesis Inhibitory Factor
- TR-1 : TNF Receptor-like molecule 1 (Yasuda H et *al* 1998)

L'acronyme le plus souvent utilisé est l'OPG. Le gène humain codant pour l'OPG est localisé sur le chromosome 8q23-24 et contient 5 exons sur un domaine de 29 kb (Yamaguchi et *al* 1998).

a) Structure :

L'OPG, contrairement aux autres membres de cette famille, ne possède ni domaine intracytoplasmique ni domaine transmembranaire et n'est donc produite que sous forme soluble (Figure 3).

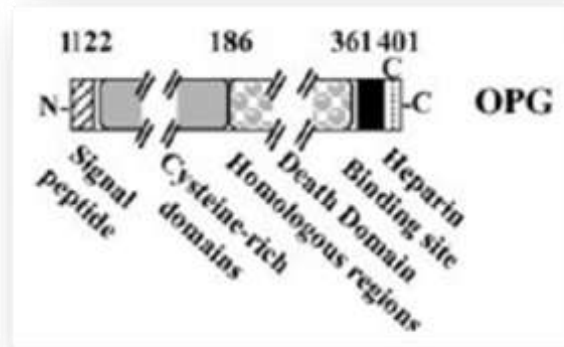


Figure 3 : Structure de l'OPG (Théoleyre et *al* 2004, Suzuki et *al* 2004). L'OPG est membre de la superfamille des récepteurs au TNF. C'est un récepteur soluble possédant en particulier un domaine de liaison à l'héparine, des domaines de mort et des domaines riches en cystéines. N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale.

Structurellement, l'OPG est une protéine de 401 acides aminés (55-62 kDa) dont les 21 premiers acides aminés correspondent à un peptide signal clivé dans la forme mature de la protéine. Dans sa partie N-terminale, les 4 domaines (D1 → D4) riches en cystéine participent à l'activité anti-ostéoclastique de l'OPG. En effet, ce sont par ces domaines que l'OPG se fixe à son principal ligand : RANKL. Son extrémité C-terminale contient deux domaines de mort D5 et D6 (« death domain homologous region») (Figure 4). La surexpression de protéines chimériques constituées d'OPG et du domaine transmembranaire de Fas est responsable de l'induction d'un processus apoptotique, démontrant ainsi la fonctionnalité des domaines de mort de l'OPG (Yamaguchi et *al* 1998). Le dernier domaine (D7) possède un site de liaison à l'héparine essentiel pour l'interaction de l'OPG avec les protéoglycanes et glycosaminoglycanes (Théoleyre et *al* 2006, Lamoureux et *al* 2009, Lamoureux et *al* 2007) notamment aux cellules de myélome via le syndecan-1 (Borset et *al* 2000). L'OPG est sécrétée principalement sous une forme dimérique (110-120 kDa) formée par l'existence d'une cystéine en position 400 dans le domaine D7 et la formation d'un pont di-sulfure. La forme dimérique apparaît biologiquement plus active que la forme monomérique et présente dans ce cas une plus grande affinité pour RANKL (2 à 3 log) ainsi qu'une capacité renforcée à se lier à l'héparine (Schneeweis et *al* 2005).

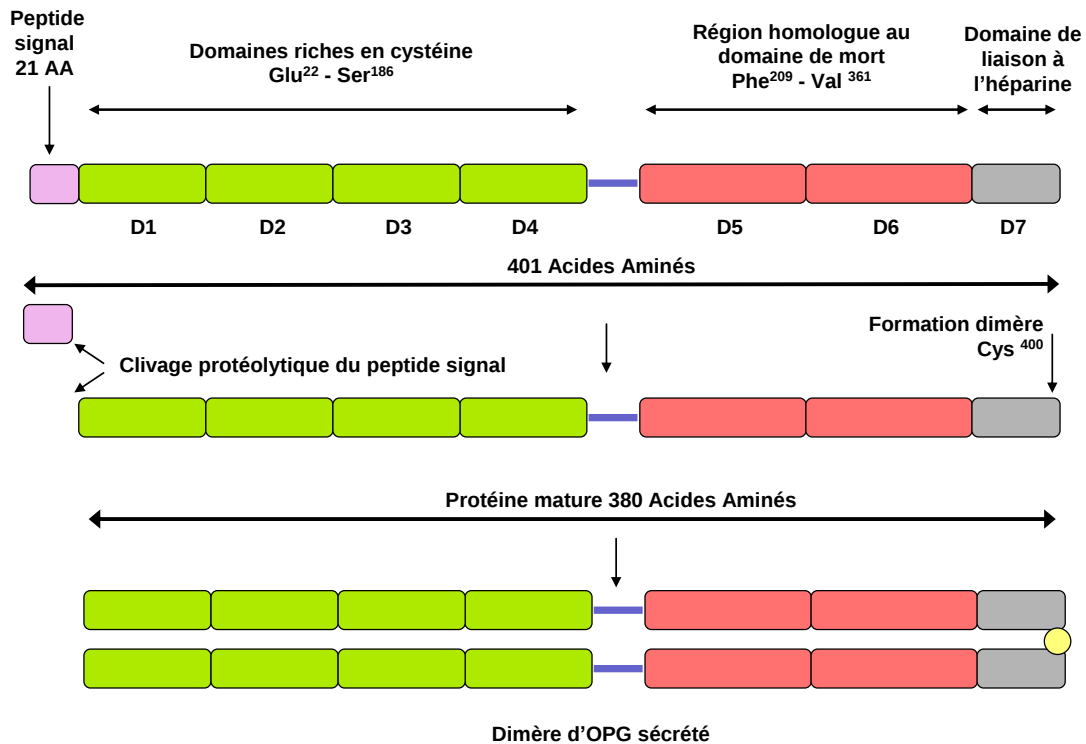


Figure 4 : Structure de l'OPG (Holen et al 2006). L'OPG est sécrétée principalement sous une forme dimérique biologiquement plus active que la forme monomérique.

b) Sources :

L'OPG est une molécule présente dans le tissu osseux, la peau, le foie, les poumons, le cœur, les artères, les veines, les reins, le placenta, les glandes mammaires et le cerveau et est donc considérée comme ubiquitaire (Collin-Osdoby 2004, Simonet et al 1997, Yasuda et al 1998). Elle est exprimée de façon prédominante par les cellules stromales de la moelle osseuse, mais son expression par les lymphocytes B et les cellules dendritiques peut également être induite par le TNF α , RANKL, l'IL-1 β et l'activation de CD40 (Schoppet et al 2007, Yun et al 1998). Enfin, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses (Collin-Osdoby et al 2001), les fibroblastes, les monocytes et les ostéoblastes humains en culture primaire expriment fortement l'OPG (Hofbauer et al 2000), ainsi que des cellules tumorales de cancers du sein ou de prostate et de thyroïde (Holen et al 2006, Heymann et al 2008).

c) Régulation :

La production de l'OPG est modulée par un très grand nombre de facteurs. Parmi eux, on peut citer l'effet stimulateur de la vitamine D3, des estrogènes, du TNF α , du TGF β et de l'interleukine-1 (IL-1) (Hofbauer et al 1998, Saika et al 2001, Thirunavukkarasu et al 2001, Théoleyre et al 2004). La PTH et la prostaglandine E2 ont, au contraire, un effet inhibiteur sur l'expression de l'OPG (Gao et al 1998, Lee et al 1999, Brändström et al 2001). Les

glucocorticoïdes diminuent également l'expression d'OPG et contribue à l'apparition d'ostéoporose chez les patients traités à long terme avec ces molécules (Hofbauer et *al* 1999).

d) Fonctions :

Les fonctions de l'OPG sont résumées dans la figure 5.

- ***L'OPG est fortement impliquée dans le remodelage osseux***

L'OPG joue donc un rôle primordial dans le remodelage osseux et dans le maintien de la masse osseuse. Les fonctions principales de l'OPG ont été clairement mises en évidence par l'établissement de souris transgéniques surexprimant l'OPG. En effet, ces souris présentent une sévère ostéopétrose associée à une diminution du nombre d'ostéoclastes et accompagnée d'une splénomégalie due à une hématopoïèse compensatoire extramédullaire et à un défaut de développement thymique (Simonet et *al* 1997). Au contraire, les souris invalidées pour l'OPG développent une ostéoporose et présentent une diminution de la densité minérale osseuse accompagnée de multiples fractures spontanées, de déformations vertébrales et d'un accroissement de la vitesse du renouvellement osseux (Bucay et *al* 1998). Ces phénomènes sont réversibles après l'injection intraveineuse d'OPG recombinante (Min et *al* 2000).

L'OPG fonctionne en réalité comme un récepteur compétiteur de RANKL empêchant ce dernier de se lier RANK (Figure 2). Elle inhibe par conséquent la différenciation et l'activation ostéoclastiques. Cependant, l'OPG possède une activité directe sur l'ostéoclaste mature et exerce donc des activités biologiques propres à l'image d'un ligand (Théoleyre et *al* 2004). Elle régule la production de protéases impliquées dans la dégradation de la matrice organique. Ainsi, Wittrant et *al.* ont montré que l'OPG diminue l'expression de la Cathepsine K et de TRAP alors qu'elle augmente celle de la MMP-9 (Wittrant et *al* 2002). Ces activités biologiques sont à mettre en relation avec la capacité de l'OPG à se lier au syndécan-1 (Mosheimer et *al* 2005).

- ***Le système vasculaire est une cible de l'OPG***

Les souris OPG^{-/-} présentent également des calcifications de l'aorte et des artères rénales (Bucay et *al* 1998). Des travaux très récents ont en effet mis en évidence le rôle préventif de l'OPG dans la calcification artérielle. En effet, l'administration d'OPG chez le rat prévient la formation de calcifications induites par la Warfarine ou de fortes doses de vitamine D, toutefois l'OPG ne peut inverser le phénomène si le processus de minéralisation a déjà débuté (Price et *al* 2001). L'OPG est présente dans les corps de Weibel-Palade des

cellules endothéliales associée au facteur de von Willebrand (Zannettino et al 2005, Baudhuin et al 2007, Baud'huin et al 2009). En réponse à des stimuli inflammatoires (comme le processus d'athérosclérose), l'OPG est relargué des corps de Weibel-Palade dans la cellule endothéliale, pouvant jouer un rôle dans l'atteinte endothéliale et l'angiogenèse (Benslimane-Ahmin et al 2011, Zannettino et al 2005, Baudhuin et al 2007, Baud'huin et al 2009). Des travaux récents ont montré que l'OPG protège la cellule endothéliale du détachement et de l'apoptose (Cross et al 2006, Kobayashi-Sakamoto et al 2006, Malyankar et al 2000) et induit la formation de structures capillaires en « cordons » à partir de cellules endothéliales humaines de veine ombilicale cultivées sur matrigel (Cross et al 2006). Dans un modèle murin *in vivo* de revascularisation de la matrice extracellulaire, Beslimane-Ahmin et collaborateurs ont montré que l'OPG induit l'activation des ECFC (Endothelial Colony-Forming cells), cellules progénitrices endothéliales de la moëlle hématopoïétique et, par la même, la formation *in vivo* d'une néogenèse vasculaire. Cette molécule pourrait donc avoir un rôle dans la revascularisation des tissus (Benslimane-Ahmim et al 2011) et contribuer à l'angiogenèse tumorale (Adams et al 2007, Peters et al 2005). Par ailleurs, en fixant à TRAIL et en bloquant son activité pro-apoptotique, l'OPG est un facteur de survie des cellules endothéliales (Emery et al 1998, Pritzker et al 2004). Des taux sériques élevés d'OPG sont observés en pathologie cardiovasculaire, notamment ischémique et semblent corrélés à la sévérité des lésions et être un facteur pronostique (Kees et al 2005, Jono et al 2010). Secchiero et collaborateurs ont montré que l'OPG agit comme un facteur de croissance autocrine/paracrine pour les cellules musculaires lisses vasculaires et contribuerait à la progression des lésions d'athérosclérose (Secchiero et al 2010).

- ***L'OPG est un des acteurs de l'ostéoinmunologie***

L'OPG possède une action sur les tissus/cellules dans lesquels RANKL intervient. Ainsi, l'OPG agit sur le système immunitaire en diminuant la survie des cellules dendritiques (Reid et al 2009). Comme on l'a déjà vu, des souris transgéniques surexprimant l'OPG présentent un défaut de développement thymique. Une augmentation de l'os trabéculaire minéralisé associée à une diminution du nombre d'ostéoclastes est également observée (Simonet et al 1997). Au contraire, les souris invalidées pour l'OPG présentent une ostéoporose et une diminution de la densité minérale osseuse accompagnée de multiples fractures et d'une stimulation de renouvellement osseux (Bucay et al 1998). La présence d'OPG est donc absolument indispensable au maintien de la masse osseuse.

- ***Rôle dans la survie cellulaire et dans l'activité protumorale***

Si le ligand principal de l'OPG est RANKL, ce récepteur est capable de se fixer à de nombreux autres facteurs. L'OPG peut ainsi fixer les glycoaminoglycanes par son domaine de liaison à l'héparine (Théoleyre et *al* 2006) mais il se fixe également à TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) (Emery et *al* 1998). TRAIL est une cytokine de la superfamille du TNF produite au sein des tumeurs par les monocytes en réponse à l'interféron- γ ou $-\alpha$ et correspond au principal médiateur de l'activité cellulaire anti-tumorale acquise (Almasan et *al* 2003, Takeda et *al* 2002). La cellule normale semble être insensible à l'action de TRAIL, servant de base à l'utilisation de TRAIL comme drogue anti-cancéreuse (Zhang et *al* 2000). Si initialement, les domaines de mort présent sur l'OPG avaient été suspectés être responsables de cette liaison, des travaux récents montrent que la liaison OPG-TRAIL s'effectue dans la région N terminale de l'OPG entre les acides aminés 1 et 194 (Lamoureux et *al* 2009). La fixation d'OPG à TRAIL inhibe l'effet pro-apoptotique de cette cytokine qui en retour bloque l'activité anti-ostéoclastique de l'OPG (Emery et *al* 1998). Des études *in vitro* ont montré que des cellules de cancers du sein et de prostate produisent des quantités suffisantes d'OPG pour se protéger de l'effet pro-apoptotique de TRAIL (Holen et *al* 2002, Holen et *al* 2005). Des résultats similaires ont été obtenus pour des lignées de carcinome du colon (Pettersen et *al* 2005). Ces travaux suggèrent donc un effet pro-tumoral direct de l'OPG dans certains cancers. En opposition de ses effets délétères sur le développement tumoral, l'OPG inhibe la croissance d'ostéosarcome ou de carcinome en site osseux dans des modèles pré-cliniques en inhibant le processus ostéolytique et donc en bloquant le cercle vicieux établi entre les cellules tumorales et les cellules osseuses (Lamoureux et *al* 2007b, Wittrant et *al* 2004, Body et *al* 2003, Morony et *al* 2005, Schramek et *al* 2011).

TRAIL exerce son effet anti-tumoral par l'intermédiaire de 2 récepteurs membranaires (DR4 et DR5). L'activation de DR4/DR5 par TRAIL induit une cascade de mort cellulaire par l'intermédiaire de signalisation commune aux membres de la famille TNF (Pan et *al* 1997, Ozoren et *al* 2003). OPG, en tant que récepteur soluble pour TRAIL, pourrait ainsi prévenir la cascade cellulaire de l'apoptose et par la même avoir un effet sur la survie cellulaire. Cet effet est contrebalancé par la liaison préalable de l'OPG avec le complexe VIII (Baud'huin et *al* 2009).

- ***L'OPG peut enfin interagir avec des molécules de la famille de l'héparine*** et ce par son domaine de liaison spécifique (Yamaguchi et *al* 1998). Il a notamment été montré que

l'OPG est capable de se fixer à la surface des cellules de myélome *via* un protéoglycane, le syndecan-1 (Borset et *al* 2000, Standal et *al* 2002) et que l'OPG est capable d'induire un chimiotactisme des monocytes en se fixant au syndecan-1 (Mosheimer et *al* 2005).

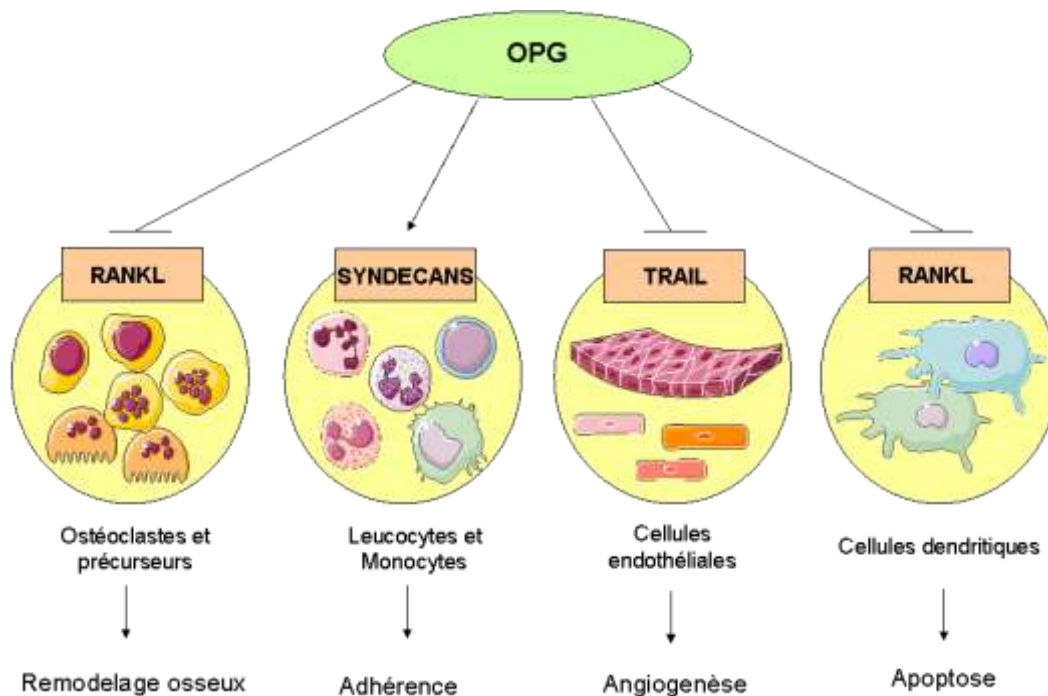


Figure 5 : Fonctions de l'OPG. Par sa capacité à se fixer à de nombreux ligands (RANKL, TRAIL, protéoglycannes, facteur von Willbrand), l'OPG est un récepteur à activités pléiotropes agissant sur trois systèmes biologiques principaux : le système ostéoarticulaire, le système immunitaire et le système vasculaire.

2) RANKL

RANKL a été identifié et cloné au même moment par deux groupes de recherche différents, l'un à partir d'une lignée de cellules stromales de la moelle osseuse murine ST2 (Yasuda et *al* 1998), et l'autre à partir de cellules myélomonocytaires murine 32D (Lacey et *al* 1998). RANKL est un polypeptide membre de la superfamille du TNF. Différentes acronymes ont été donnés à ce facteur :

- OPGL : Osteoprotegerin Ligand
- TRANCE : TNF-Related Activation-Induced Cytokine
- ODF : Osteoclast Differentiation Factor

La nomenclature officielle lui a attribué le nom TNFSF11 (11^{ème} membre de la Super Famille du TNF). Le gène codant pour RANKL humain est localisé sur le chromosome 13 en 13q14. Le gène murin est localisé sur le chromosome 14 (Lacey et *al* 1998).

a) Structure :

RANKL est une protéine transmembranaire de type II (partie N-terminale intracellulaire) sans peptide signal (Hofbauer et *al* 2000) montrant une homologie d'environ 30% avec TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et CD40, et d'environ 20% avec Fas-Ligand (Wong et *al* 1997). Que ce soit chez la souris ou chez l'homme, RANKL existe sous trois isoformes résultant de l'épissage alternatif d'un même gène (Ikeda et *al* 2001, Suzuki et *al* 2004) (Figure 6).

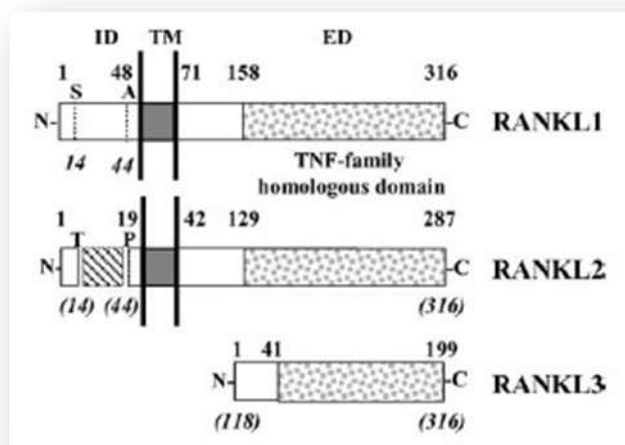


Figure 6: Structure de RANKL (Théoleyre et *al* 2004, Suzuki et *al* 2004). Trois isoformes de RANKL ont été mises en évidence chez l'Homme et la souris, deux formes transmembranaires et une forme soluble. La forme soluble peut être également produite par coupure protéolytique. RANK-L de souris (mRANK-L) et RANK-L humain (hRANK-L). IC : domaine intracellulaire ; TM : domaine transmembranaire ; EC : domaine extracellulaire ; N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale.

L'isoforme RANKL1 correspond à une protéine transmembranaire de 317 acides aminés chez la souris et 316 chez l'Homme, possédant un domaine intra-cytoplasmique complet lui qui pourrait lui permettre d'interagir avec des molécules intracellulaires. RANKL3 est une protéine soluble monomérique de 199 acides aminés chez la souris et 244 chez l'Homme, intracytoplasmique et non sécrétée, déletée dans sa partie N-terminale pour les acides aminés correspondant aux domaines intra-cytoplasmique et transmembranaire de RANKL1. Quant à l'isoforme RANKL2, elle est de structure différente suivant l'espèce : RANKL2 de souris (287 acides aminés) possède un court domaine intra-cytoplasmique alors que RANKL2 humain (244 acides aminés) en est dépourvu. Dans le milieu extracellulaire, la forme soluble de RANKL peut également être libérée de la membrane plasmique après clivage par des protéases comme ADAM-10 (a desintegrin and metalloprotease), ADAM-17, la MMP-7 (Matrix Metalloproteinase), la MMP-14 (Georges et *al* 2009, Hikita et *al* 2006, Lum et *al*

1999). Le rôle exact de ces trois isoformes est très mal connu mais en fonction de la nature de leur multimérisation, ces isoformes réguleraient l'ostéoclastogenèse (Ikeda *et al* 2001). Par ailleurs, les isoformes membranaires de RANKL contrôlent la biodisponibilité de l'OPG en régulant sa dégradation par le lysosome et le protéasome (Kwan Tat *et al* 2006).

b) Sources :

RANKL est exprimé par un grand nombre de cellules et de tissus, mais plus fortement par le squelette (os, moelle osseuse, cartilage) (Lacey *et al* 1998, Yasuda *et al* 1998), les organes lymphoïdes (ganglions, thymus, rate, foie fœtal) et par le système vasculaire (Collin-Osdoby *et al* 2001). L'ARNm de RANKL a été détecté dans différentes lignées de cellules stromales (ST2, MC3T3-E1) et d'ostéosarcome (UMR-106, SaOS2), dans des ostéoblastes murins en culture primaire et dans les chondrocytes hypertrophiques murins (Kartsogiannis *et al* 1999). RANKL est également exprimé en grande quantité par les lymphocytes T, les cellules endothéliales et les glandes mammaires (Anderson *et al* 1997, Srivastava *et al* 2003). Enfin une expression faible de RANKL a été mise en évidence dans le cerveau, le cœur, les poumons, les reins et le placenta (Kartsogiannis *et al* 1999).

c) Régulation :

Bien qu'exprimant peu RANKL à l'état basal contrairement aux cellules stromales, la production de RANKL par les ostéoblastes matures est fortement augmentée par de nombreux facteurs ostéotropiques (Théoleyre *et al* 2004). De la même manière que l'OPG, l'expression de RANK-L est régulée par de très nombreux facteurs. Notamment, le taux d'ARNm de RANK-L est stimulé par la vitamine D3, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-11, le TNF α , l'oncostatine M, la PTH et la prostaglandine E2 (Hofbauer *et al* 1998, Nakashima *et al* 2000, Palmqvist *et al* 2002, Huang *et al* 2004). A l'opposé, il est inhibé notamment par le TGF β et l'IL-13 (Nakashima *et al* 2000).

d) Fonctions :

- ***RANKL est un facteur indispensable à la formation des ostéoclastes***

In vitro, RANKL en se fixant à son récepteur RANK présent à la surface des pré-ostéoclastes (Yasuda *et al* 1998) induit en présence de M-CSF (Suda *et al* 1999) leur différenciation en ostéoclastes matures (Lacey *et al* 1998). RANK-L est en outre un facteur de survie des ostéoclastes matures (Fuller *et al* 1998, Wong *et al* 1999). Le phénotype des souris transgéniques ou invalidées pour RANKL ont des phénotypes opposés entre eux et opposés à ce qui est observée pour l'OPG. Ainsi, des souris invalidées pour RANKL présentent une

ostéopétrose sévère associée à une absence totale d'ostéoclastes fonctionnels due à l'incapacité des ostéoblastes à supporter l'ostéoclastogenèse, induisant une augmentation de la densité minérale osseuse et une hématopoïèse compensatoire extramédullaire (Kong et *al* 1999). A l'inverse, après injection de RANKL, des souris naïves ont développé une ostéoporose importante (Hofbauer et *al* 2000).

- ***Rôle de RANKL dans le développement des glandes mammaires***

Il a été montré que RANKL était responsable de la prolifération de l'épithélium mammaire murin en réponse à la progestérone durant la morphogenèse (Beleut et *al* 2010). Les souris transgéniques invalidées pour RANKL développent une maturation sexuelle normale mais présentent un défaut de développement des glandes mammaires durant la grossesse par inhibition de la prolifération et augmentation de l'apoptose de l'épithélium mammaire ; cela engendre la mort des nouveaux-nés, ce processus pouvant être contrebalancé par l'injection de RANKL exogène (Fata et *al* 2000). D'autre part lorsque la voie RANK/RANKL est activée en l'absence de contrôle hormonal, une prolifération inappropriée de l'épithélium mammaire est observée (Fernandez-Valdivia et *al* 2009, Gonzalez-Suarez et *al* 2007). Gonzales-Suarez et *al* (2007) ont ainsi montré que RANK et RANKL sont exprimés à la fois par l'épithélium mammaire normal, dysplasique et carcinomateux murin. Les deux molécules contribueraient directement à la cancérogénèse mammaire, l'inhibition de RANKL induisant une diminution du développement tumoral (Gonzalez-Suarez et *al* 2010). La prise de progestatifs, utilisés usuellement comme substitutif hormonal de la ménopause ou comme contraceptif oral, augmente l'induction de RANKL au sein de l'épithélium mammaire (Schramek D et *al* 2010).

- ***Rôle de RANKL dans le système ostéoimmunitaire***

Le concept d'ostéoimmunologie décrit l'interaction entre le système immunitaire et le système ostéoarticulaire. La plupart des cellules immunitaires sont capables d'interagir avec les ostéoblastes, ostéoclastes et leurs progéniteurs respectifs et inversement. Les cellules immunitaires (lymphocytes T, lymphocytes B, mégakaryocytes, mastocytes et macrophages) participent à l'homéostasie du tissu osseux (Raggatt et *al* 2010). D'autre part, les exemples de pathologies faisant intervenir cette ostéoimmunologie ne manquent pas (ostéoporose, arthrite rhumatoïde, maladie périodontale...)(Gruber et *al* 2010). RANKL joue également un rôle majeur dans les fonctions immunitaires puisqu'il semble être très fortement impliqué dans la

régulation de l'organogenèse des ganglions lymphoïdes et dans la maturation des cellules du thymus (Kong et *al* 1999). Le rôle de RANKL dans le système immunitaire peut être étendu aux cellules dendritiques (il est capable de stimuler leur activation et leur survie) et aux monocytes (il agirait comme un facteur chimiotactique) (Mosheimer et *al* 2005, Lum et *al* 1999).

- ***Rôle pro-tumoral de RANKL***

Enfin, certaines cellules cancéreuses expriment une forme fonctionnelle du récepteur RANK donnant à RANKL une implication pro-tumorale (Kim et *al* 2006, Ando et *al* 2008, Mori et *al* 2009). RANKL intervient également dans les processus métastatiques des cancers du sein, de la prostate, du rein et de la thyroïde (Armstrong et *al* 2008, Jones et *al* 2006, Mikami et *al* 2009, Mori et *al* 2007, Heymann et *al* 2008). Il facilite la migration de cellules cancéreuses à l'origine de leur dissémination dans l'organisme (Mori et *al* 2009)

3) RANK

Cette molécule a été découverte en 1997 par Anderson et *al* RANK appartient à la superfamille des récepteurs au TNF et possède environ 40% d'homologie avec CD40. Son nom dans la nomenclature officielle est TNFRSF11A.

D'autres acronymes sont utilisés :

- TRANCE-R : TRANCE-receptor
- ODAR : Osteoclast Differentiation and Activation Receptor

Le gène humain codant pour RANK est localisé sur le chromosome 18q22.1. Le gène murin est localisé sur le chromosome 1 (Wong et *al* 1998).

a) Structure :

RANK est une protéine transmembranaire de type I (partie N-terminale extracellulaire), de 616 acides aminés (90kDa) possédant un peptide signal (Anderson et *al* 1997). RANK se présente à la membrane sous forme d'un récepteur trimérique (Figure 7). Le domaine extracellulaire de RANK contient 4 motifs riches en cystéine et deux sites de N-glycosylation (Hofbauer et *al* 2000). Une forme soluble a été détectée dans des surnageants de culture d'ostéoclastes après activation par RANKL mais son rôle exact reste indéterminé (Hakozaki et *al* 2010). Très récemment, un nouveau variant murin de RANK issu d'un

splicing alternatif a été mis en évidence dans des cellules myéломonocytaires RAW264.7 (Mukai *et al* 2011). Ce variant qui correspond à une forme cytoplasmique et membranaire, régulant négativement l'ostéoclastogenèse.

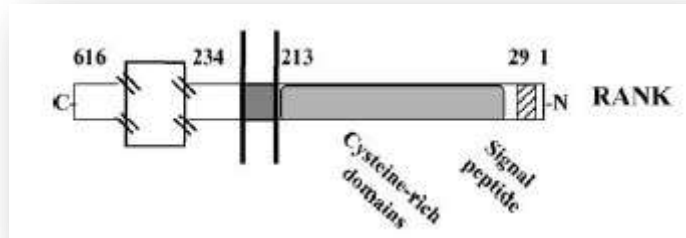


Figure 7 : Structure de RANK (Théoleyre *et al* 2004, Suzuki *et al* 2004). RANK est un récepteur transmembranaire existant également sous une forme soluble dont la fonction est mal connue.

b) Sources

RANK, récepteur de RANKL, est présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques et des ostéoclastes matures au niveau osseux, et il est également exprimé par les lymphocytes, les cellules dendritique, les cellules endothéliales et des fibroblastes. L'expression de RANK a été détectée dans différents tissus comme le muscle squelettique, la peau, le cerveau, les poumons, le foie (Anderson *et al* 1997, Min *et al* 2000, Nakagawa *et al* 1998).

c) Régulation

D'une manière générale, RANK est une protéine dont l'expression est peu modulée par des facteurs exogènes. L'expression de RANK peut-être stimulée par le CD40-Ligand sur les cellules dendritiques et par l'engagement du TCR associée au TGF β et à l'IL-4 sur les lymphocytes T. Par contre, son expression sur les pré-ostéoclastes et les ostéoclastes matures ne semble pas être régulée par les principaux agents ostéotropiques (Théoleyre *et al* 2004).

d) Fonctions

RANK est essentiel à la différenciation et à la survie des ostéoclastes. En effet, des souris transgéniques invalidées pour ce gène (souris RANK^{-/-}) présentent une ostéopétrose sévère associée à un manque d'ostéoclastes matures, phénotype similaire à celui des souris délétées pour le gène RANKL (Li *et al* 2000). Différentes études ont montré que RANKL se lie spécifiquement à RANK à la surface des pré-ostéoclastes avec une haute affinité (3 nM) et que cette liaison entraîne l'activation de RANK indispensable à l'ostéoclastogenèse (Hsu *et al* 1999 ; Nakagawa *et al.*, 1998). Les souris déficiente en RANK (RANK^{-/-}), en plus de

développer une ostéopétrose, présentent une absence de ganglions lymphoïdes et un défaut de maturation des lymphocytes B et T alors qu'elles ont un développement thymique normal (Li et *al* 2000) contrairement aux souris RANKL^{-/-}. Des souris transgéniques exprimant la protéine de fusion soluble RANK-Fc présentent quant à elles un phénotype squelettique similaire à celui des souris transgéniques pour l'OPG c'est-à-dire une diminution de l'ostéoclastogenèse et de la résorption osseuse (Hsu et *al* 1999). L'ensemble de ces études montre donc que la fixation de RANKL à RANK induit la transduction d'un signal conduisant notamment à la différenciation des précurseurs ostéoclastiques et à l'activation des ostéoclastes.

La figure 8 (page suivante) résume les actions de la triade OPG/RANK/RANKL dans les systèmes ostéoarticulaire, immunitaire et vasculaire.

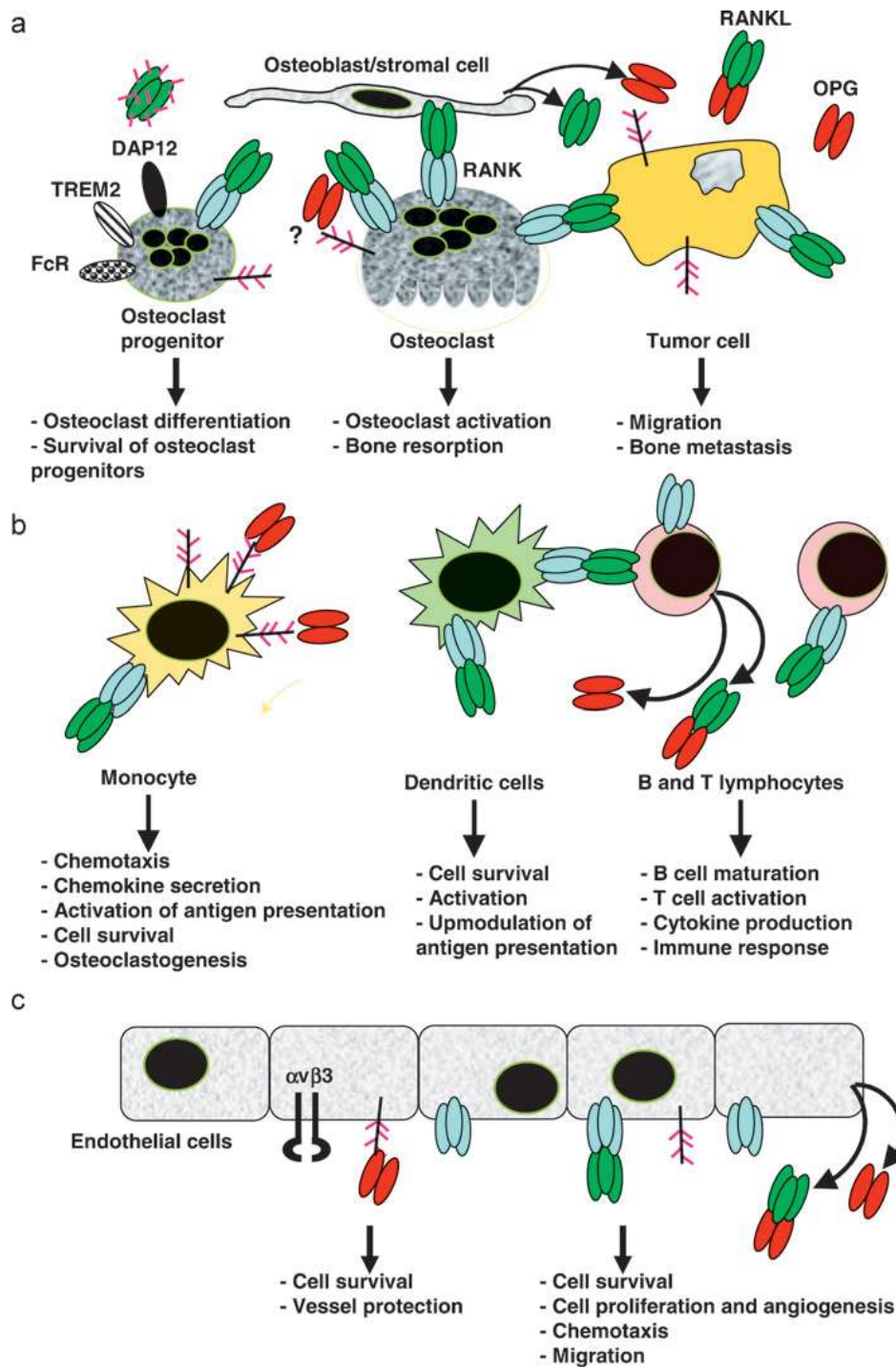


Figure 8 : Action de l'OPG/RANK/RANKL (Baud'huin et al 2007), molécules clés de l'ostéoimmunologie et des pathologies vasculaires. a) OPG/RANK/RANKL participe au remodelage osseux ; b) OPG/RANK/RANKL module le système immunitaire via les monocytes, cellules dendritiques et les lymphocytes B et T ; c) OPG/RANK/RANKL intervient dans le système vasculaire via la cellule endothéliale et la cellule musculaire lisse.

II. Implication de la triade OPG/RANK/RANKL en pathologie vasculaire

Nous avons donc vu dans les différents chapitres précédents la position particulière de la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL au croisement entre les systèmes ostéoarticulaire, immunologique, vasculaire et tumoral. Cette implication dans le système vasculaire va être un peu plus détaillée.

La première preuve démontrant l'implication de la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL dans la biologie vasculaire a été apportée par le phénotype des souris déficientes en OPG. Ces souris, atteintes d'une ostéoporose sévère, présentent des calcifications au niveau de l'aorte et des artères rénales mais pas au niveau des petits vaisseaux. (Bucay et *al* 1998). Les lésions observées ressemblent aux lésions athérosclérotiques de l'homme, dans lesquelles est retrouvée une expression du récepteur RANK et du ligand RANKL. Ces premières observations ont depuis été étayées par des travaux *in vitro* et *in vivo*. Désormais, il est bien établi que le système OPG/RANK/RANKL est impliqué dans la biologie des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses des vaisseaux (Baud'huin et *al* 2007). Cette triade est également associée à la survenue des calcifications artérielles.

Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses expriment toutes les deux l'OPG, à des taux relativement élevés mais plus particulièrement dans les artères rénales et aortiques. En revanche, RANK et RANKL ne sont pas détectés dans les vaisseaux sains non calcifiés (Collin-Osdoby et *al* 2001), bien qu'une faible expression de RANKL ait été observée dans des lésions aortiques humaines (Dhore et *al* 2001) ou dans des vaisseaux de métaphyse de souris (Lacey et *al* 1998). Sous l'action de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 α ou le TNF α , les cellules endothéliales expriment fortement l'OPG et RANKL (Ben-Tal Cohen et *al* 2007, Collin-Osdoby et *al* 2001). RANKL sur-exprimé à la surface de ces cellules est fonctionnel, puisqu'il induit la différenciation ostéoclastique de précurseurs monocytiques (Collin-Osdoby et *al* 2001).

Les cytokines OPG et RANKL, en plus d'être produites par les cellules endothéliales, ont des effets directs sur celles-ci. L'OPG est en effet capable d'induire la survie des cellules endothéliales par une voie dépendante des intégrines (Malyankar et *al* 2000, Scatena et *al* 2002). Mais une autre voie de survie est désormais envisagée, l'OPG en se liant à TRAIL empêcherait l'effet pro-apoptotique de cette cytokine de la famille du TNF

(Emery et *al* 1998, Pritzker et *al* 2004). TRAIL réduit également l'expression d'OPG par les cellules stromales (Corallini et *al* 2011). D'autre part, l'OPG assure la migration et la prolifération des cellules endothéliales par une voie dépendante des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ (Kobayashi-Sakamoto et *al* 2008). Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, RANKL est également capable d'induire la survie des cellules endothéliales. Dans des cellules HUVEC soumis à une privation de sérum ou à un traitement par $\text{TNF}\alpha$, RANKL prévient partiellement la mort des cellules endothéliales *via* la stimulation de la voie PI3K/Akt (Kim et *al* 2003). RANKL est également impliqué dans la prolifération et le chimiotactisme des cellules endothéliales, il permet la néo angiogenèse (comparable au bFGF) *in vivo* dans deux modèles différents (Kim et *al* 2002). L'OPG en stimulant les précurseurs endothéliaux favorise l'angiogenèse (Benslimane-Ahmin et *al* 2011). C'est la liaison de RANKL au récepteur RANK présent à la surface des cellules endothéliales qui initie des signaux SRC/phospholipase C/ Ca^{2+} induisant la formation de nouveaux vaisseaux que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques (Tableau I).

Tableau 1 : Effets du système OPG/RANKL sur la biologie des cellules endothéliales

Cytokines	Effets sur les cellules endothéliales	Références
OPG	Survie par la voie des intégrines via NF-kB	Malyankar et <i>al.</i> , 2000 ; Scatena et Giachelli, 2002
	Survie par inhibition de TRAIL	Pritzker et <i>al.</i> , 2004
	Migration et prolifération par la voie des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$.	Kobayashi-Sakamoto et <i>al.</i> , 2008
	Stimulation de la prolifération des précurseurs endothéliaux	Benslimane-Ahmin et <i>al.</i> , 2011
RANKL	Survie par la voie PI3 kinase	Kim et <i>al.</i> , 2003
	Prolifération et chimiotactisme permettant une néo-angiogenèse	Kim et <i>al.</i> , 2002

De nombreux travaux ont montré l'implication des cytokines OPG et RANKL dans la survenue des lésions athérosclérotiques. Depuis l'étude des souris déficientes en OPG (Bucay et *al* 1998), le rôle protecteur de l'OPG dans la survenue de calcifications artérielles a été confirmé. En effet, l'administration d'OPG chez le rat prévient la formation de calcifications induites par la Warfarine ou de fortes doses de vitamine D, toutefois l'OPG ne peut inverser le phénomène si le processus de minéralisation a déjà débuté (Price et *al* 2001). La capacité de l'OPG à promouvoir la survie des cellules endothéliales suggère que l'OPG protège potentiellement du processus de calcification. D'autre part, RANKL et OPG sont différemment exprimés dans les sténoses aortiques calcifiées (Kaden et *al* 2004). En effet, alors que RANKL est fortement exprimé dans les lésions calcifiées, l'OPG n'est détectée que dans le tissu sain et non dans le tissu pathologique. De plus, dans des cultures de myofibroblastes de valve aortique humaine, RANKL favorise la calcification de la matrice et l'expression de gènes associés à l'ostéoblaste. Enfin, les cellules endothéliales de la microvascularisation produisent un environnement favorable à la formation d'un tissu calcifié et stimulent aussi l'adhérence et la migration transendothéliale de monocytes, pouvant se différencier en ostéoclastes sous l'action de RANKL (Kindle et *al* 2006). Plus récemment, l'anticorps humanisé dirigé contre RANKL (Denosumab[®]) a prouvé son efficacité dans les atteintes vasculaires. Il prévient le dépôt de calcium dans les artères de souris surexprimant la forme humaine de RANKL (Helas et *al* 2009). L'ensemble de ces résultats montrent l'implication des cytokines RANKL et OPG dans la survenue des calcifications artérielles.

III. Triade et calcifications artérielles

1) Les calcifications vasculaires

Les calcifications vasculaires peuvent concerner l'ensemble de l'arbre artériel depuis l'aorte ascendante jusqu'aux capillaires et correspondre à quatre variantes histoanatomiques (Figure 9), chaque type étant associé à un spectre de pathologie vasculaire spécifique (Vattikuti et *al* 2004). Il s'agit de :

- La calcification intinale au cours de l'athérosclérose
- La calcification valvulaire cardiaque
- La calcification de la média artérielle
- La calciphylaxie

Les calcifications intinales sont caractéristiques de l'**athérosclérose**. Elles surviennent de manière disséminées dans les artères dont elles réduisent le calibre (on parle de « patchy pattern »). Elles sont pourvoyeuses de sténoses, embolies et thromboses. Ces calcifications sont de type dystrophiques caractérisées par de la nécrose cellulaire, de l'inflammation associée à des lipoprotéines et phospholipides complexes. La calcification est notée en premier dans la plaque fibrocalcique, suivie par la formation de cartilage calcifié puis d'ossification enchondrale (Vattikuti et *al* 2004).

Les calcifications valvulaires cardiaques sont la résultante de stress mécanique et de réaction inflammatoire aboutissant à une ossification non enchondrale. Aux étapes les plus précoces, il existe une accumulation de lipides avec expansion de tissu adipeux au sein du tissu valvulaire, associé à un infiltrat macrophagique et lymphocytaire T (Vattikuti et *al* 2004).

Les calcifications de la média, connues également sous le nom de sclérose de Mönckeberg, sont plus diffuses. Elles sont associées à l'âge, l'insuffisance rénale et le diabète. Elles conduisent à une augmentation de la rigidité de la paroi artérielle et sont pourvoyeuses d'hypertension, d'insuffisance cardiaque et augmentent le risque d'amputation chez les diabétiques de type 2 (Lehto et *al* 1996).

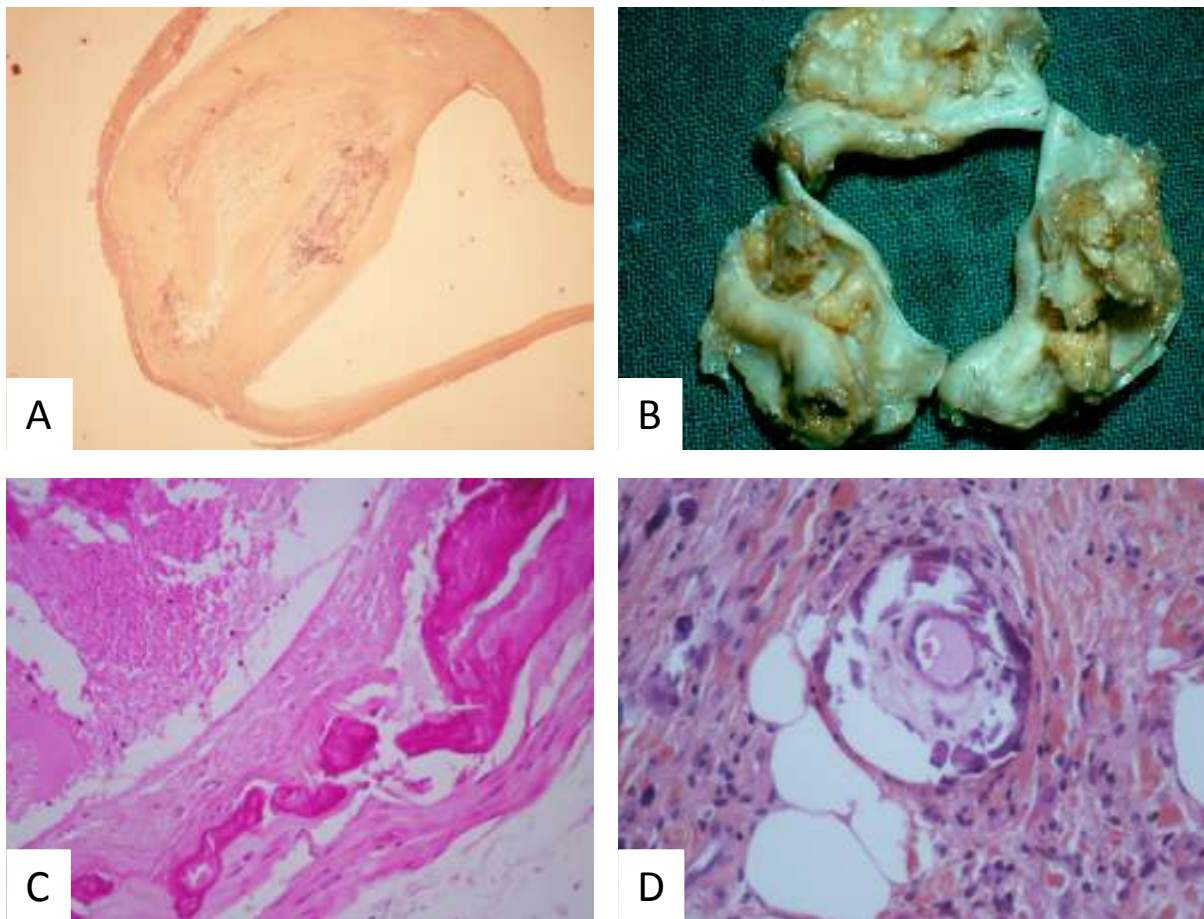


Figure 9 : Calcifications vasculaires – Les quatre variantes histologiques

- A) Calcification intimale de l'athérosclérose, HES x 50
- B) Calcifications valvulaires : rétrécissement aortique calcifié
- C) Calcifications de la média : médiacalcosse de l'artère temporale, HES x 200
- D) Calciphylaxie de l'insuffisance rénale avancée, HES x 400

La calciphylaxie ou artériolopathie calcifiante urémique est une forme sévère et mortelle de calcification de la média qui aboutit à une nécrose cutanée et à une panniculite. Elle atteint les patients avec insuffisance rénale avancée, spécifiquement ceux recevant de la warfarine. Sur le plan histologique, il s'agit d'une vasculopathie caractérisée par des patchy calcifications des artérioles avec prolifération intimale, occlusion sur thrombose, fibrose, inflammation et nécrose. Les tissus pulmonaires et mésentériques peuvent être atteints avec une mortalité atteignant 100% dans les deux premières années de la maladie (Demer et *al* 2008).

2) Mécanismes moléculaires de la calcification artérielle dans l'athérosclérose

Ces calcifications sont donc purement intimes au cours du développement de la plaque athéromateuse. Contrairement à l'hypothèse première d'une précipitation passive, les calcifications artérielles semblent être le résultat d'un processus d'ostéogenèse intraartériel, partageant de nombreux points avec l'ostéogenèse physiologique (Stary et *al* 2000). Ainsi, la minéralisation de la plaque athéromateuse peut provenir de deux types de processus semblables à la formation orthotopique du tissu osseux (Karsenty 2003, Abedin et *al* 2004)

- L'ossification endochondrale : calcification du cartilage médiée par les ostéoblastes
- L'ossification intra-membraneuse : calcification de la matrice extracellulaire médiée par les ostéoblastes.

a) Rappels sur l'ostéogenèse

L'ostéogenèse ou formation du tissu osseux utilise un processus de métaplasie au cours duquel un tissu conjonctif est transformé en tissu osseux. La vascularisation des sites remaniés est une condition nécessaire au bon déroulement des différents processus d'ossification, qui se déroule en deux phases : primaire et secondaire.

- **L'ossification primaire :**

L'ossification primaire correspond à la formation d'un tissu osseux sur un support non osseux. Elle débute durant la vie embryonnaire ou fœtale, à des moments variables suivant les pièces osseuses. La formation d'os peut débiter à partir d'un tissu conjonctif : c'est la formation **endoconjonctive** (Figure 10) qui correspond soit à *l'ossification périostique* pour la

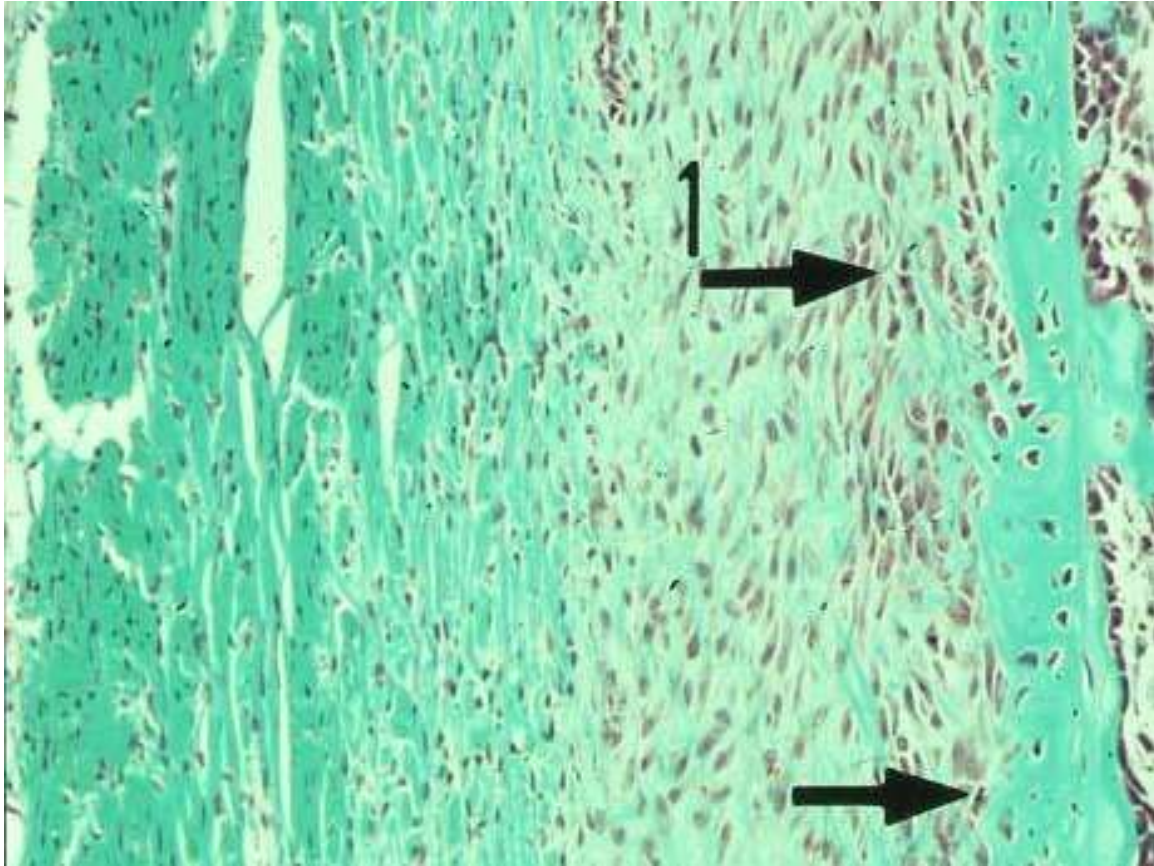


Figure 10 : Ossification membraneuse (Trichrome de Masson)(Atlas d'Histologie humaine et animale-Thibaut et al). L'élargissement du tube diaphysaire se fait par apposition de tissu osseux périosté, suivant le sens de la flèche. En 1 est fléché le feuillet fertile du périoste, très cellulaire. Il se métaplasie en ostéoblastes puis ostéocytes, sans support cartilagineux préalable.

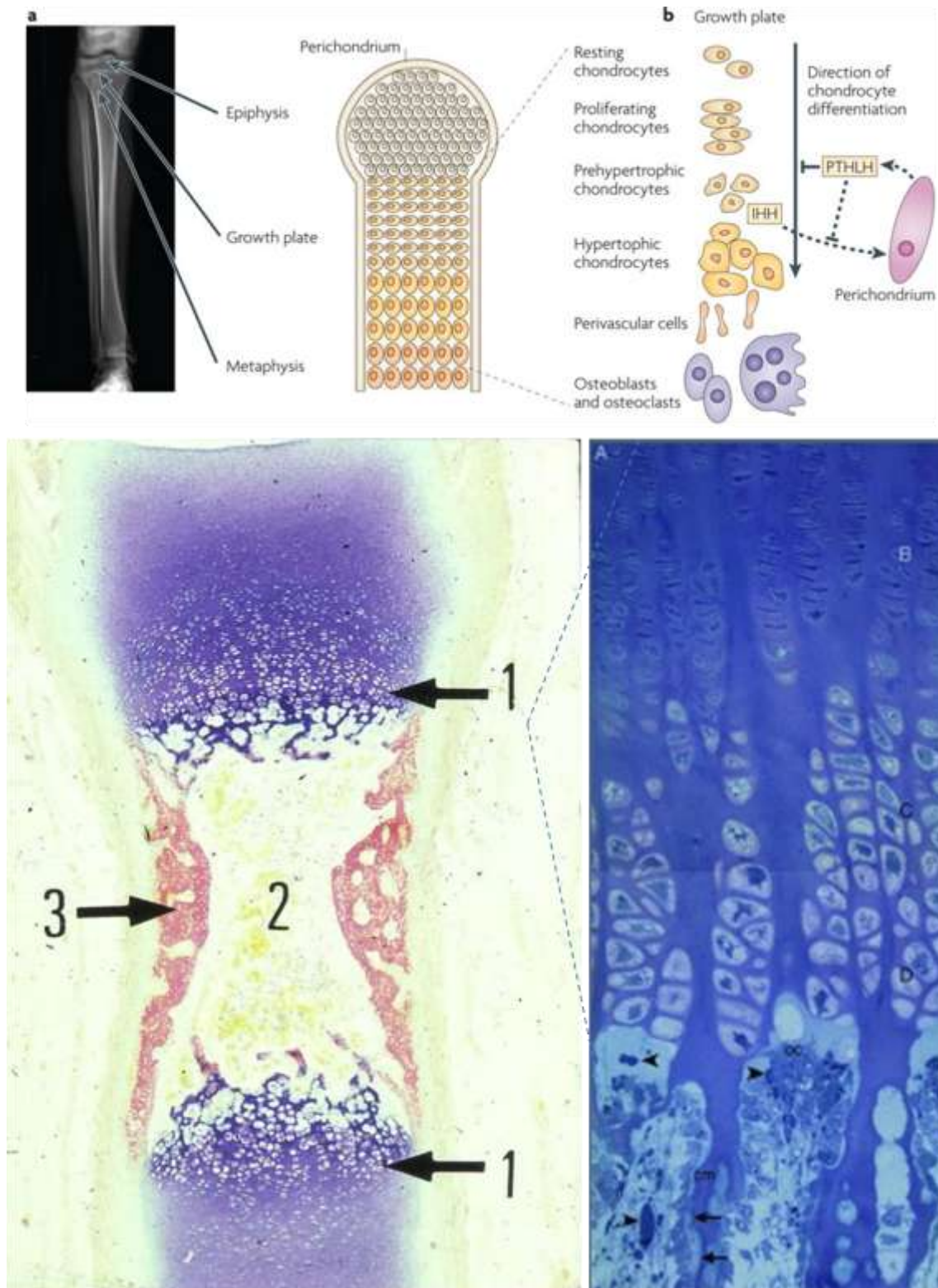


Figure 11 : Ossification endochondrale (Bovée et *al* 2010, Atlas d'Histologie humaine et animale-Thibaut et *al*). A ce stade, le processus d'ossification endochondrale se déroule en 1, à la base des épiphyses. Les travées osseuses endochondrales du centre de la diaphyse ont été résorbées. Ainsi s'est mise en place la cavité médullaire en 2. Elle est bordée en 3 par du tissu osseux formé par métaplasie du périoste, sans support cartilagineux préalable. Ce dernier type d'ossification est dit "membraneux".

diaphyse des os longs, soit à *l'ossification membranaire* pour les os plats. Elle peut débiter à partir d'un tissu cartilagineux hyalin : c'est *l'ossification endochondrale* ou *enchondrale* comme au niveau de la diaphyse des os longs, des épiphyses des os longs ou des os courts (Figure 11).

- **L'ossification secondaire :**

L'ossification secondaire correspond à la formation d'un tissu osseux sur un support osseux, après une phase préalable de destruction de la matrice osseuse préexistante par les ostéoclastes. Elle élabore un os plus résistant et mieux vascularisé : c'est la formation des ostéons. Elle survient principalement au niveau de la diaphyse des os longs.

Trois sortes de cellules sont impliquées dans la biologie du tissu osseux (formation, dégradation, remodelage).

- Les *ostéoblastes*, cellules ostéoformatrices, sont responsables de la production des constituants de la matrice osseuse (et notamment du collagène I) et de sa minéralisation. A l'issue de la période de formation osseuse, certains ostéoblastes retrouvent un état quiescent, certains vont mourir par apoptose et quelque uns pour une raison inconnue sont englobés dans une matrice extracellulaire organique qui se minéralise peu à peu et deviennent des ostéocytes.
- Les *ostéocytes* qui représentent 90% des cellules de l'os, correspondent à la différenciation terminale de la lignée ostéoblastique. Ils sont incapables de proliférer et sont entourés entièrement de matrice extracellulaire osseuse calcifiée au sein d'une lacune périostéocytaire : l'ostéoplaste. Les ostéocytes sont reliés entre eux et aux ostéoblastes par des jonctions cellulaires de type jonctions communicantes ou jonctions gap assurées par des molécules connexines de type 43 (Civitelli et al 2008). Ainsi les ostéocytes communiquent entre eux et avec les cellules bordantes qui recouvrent la surface osseuse. Les ostéocytes assurent la transmission des signaux mécano-sensoriels et permettent ainsi le maintien de l'équilibre osseux.
- Les *ostéoclastes* sont responsables de la dégradation du tissu osseux, étant les seules cellules capables de résorber l'os. Les ostéoclastes, issus de la fusion de plusieurs précurseurs, sont des cellules géantes (10 à 100 µm de diamètre) multinucléées contenant le plus souvent de 10 à 20 noyaux. Ces cellules sont visibles au fond des

lacunes de résorption appelées lacunes de Howship, au contact de la matrice osseuse calcifiée. Une des caractéristiques propres à l'ostéoclaste actif est sa bordure en brosse constituée d'une succession d'expansions et d'invaginations de la membrane cytoplasmique apicale adjacente à la surface osseuse (Suda et *al* 1992). Lorsque les ostéoclastes sont actifs et forment cette bordure en brosse, une zone spécialisée dénommée zone claire est observée. Cette zone, dépourvue d'organites intracellulaires et riche en filaments d'actine, correspond à une région où la membrane plasmique est en contact avec l'os délimitant ainsi un compartiment clos entre la bordure en brosse et la surface osseuse. Le processus de résorption est réalisé dans ce compartiment appelé chambre de résorption (Rousselle et *al* 2002).

Les protéines non-collagéniques (ostéocalcine, ostéopontine, ostéonectine) les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes (décorine, biglycan) constituent avec le collagène le tissu ostéoïde. Puis le processus de minéralisation de ce tissu ostéoïde intervient 10 jours après le dépôt de la matrice organique. Il dépend d'une part de la présence d'une structure matricielle extracellulaire, et d'autre part d'une concentration adéquate en minéraux. La calcification de la matrice se fait par l'intermédiaire des vésicules matricielles émises par l'ostéoblaste contenant de fortes concentrations de phosphatase alcaline, ostéocalcine et pyrophosphatases. Les ions minéraux, calcium et phosphate entre autres, précipitent et se déposent dans ces vésicules sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite. Les cristaux d'hydroxyapatite se déposent entre les fibres de collagène, ce qui confère à l'os sa résistance à la rupture, en plus de sa résistance à l'étirement (Mace et *al* 2008).

b) Modèles de minéralisation artérielle

Différents mécanismes de calcification de la plaque athéromateuse ont été identifiés avec des similitudes avec le processus d'ossification. Deux processus principaux intéressant l'athérosclérose peuvent être proposés : une diminution de la résorption minérale (ou inhibition de la minéralisation) de type ostéoclaste-like (OCL) et une augmentation de dépôt minéral (ou induction de l'ostéogénèse) de type ostéoblaste-like (OBL). Les modèles de

calcification passive physicochimique intéressent plus préférentiellement la maladie de Mönckeberg.

- **Le modèle de « calcification OBLike »**

En 1993, Boström et collaborateurs ont montré la présence de cellules vasculaires calcifiées, immunologiquement distinctes des autres cellules artérielles. Ces cellules colocalisaient avec des protéines et des facteurs transcriptionnels du processus d'ostéogénèse comme BMP-2 et Cbfa1 ou RUNX-2 (Boström et *al* 1993, Engelse et *al* 2001). En outre, ces cellules étaient capables de produire des structures minéralisées *in vitro* (Watson et *al* 1994, Balica et *al* 1997, Proudfoot et *al* 1998). Ces résultats ont été confirmés par d'autres groupes, sur d'autres cellules artérielles comme les cellules musculaires lisses (Shioi et *al* 2002, Wada et *al* 1999). Le terme de modèle de calcification active vient du fait que ces cellules sont capables de synthétiser du tissu calcifié (OBL cellules). Des manipulations *in vivo* chez l'homme et l'animal ont confirmé ces données, avec observation d'une minéralisation artérielle comparable à celle qui est observée dans le tissu osseux (Qiao et *al* 2003, Fitzpatrick et *al* 2003, Bea et *al* 2002).

- **Le modèle de « calcification OCLike »**

Nous l'avons vu, le remodelage osseux résulte d'un équilibre entre formation osseuse via les ostéoblastes et résorption via les ostéoclastes. Le modèle artériel de calcification OCLike met l'accent sur la perte d'activité des cellules OC like (Figure 12). Différents facteurs influencent la survie et la différenciation des cellules OC like, comme le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), une cytokine et facteur de croissance pour les cellules macrophagiques. Des manipulations *in vivo* ont montré le rôle primordial du M-CSF dans la survie et la différenciation des précurseurs ostéoclastogènes : le manque de M-CSF induit la réduction du nombre d'ostéoclastes et l'apparition d'une ostéopétrose (Stanley et *al* 1997, Wiktor-Jedrzejczak et *al* 1990 et 1991). En contre-partie, des souris invalidées pour le M-CSF et l'apolipoprotéine E développent des calcifications artérielles malgré une diminution significative des lésions athéromateuses (Qiao et *al* 1997). Ces résultats montrent le double rôle de ce facteur dans le processus d'athérosclérose en promouvant la formation de la plaque athéromateuse et en inhibant la calcification de cette plaque (inhibe sa complication) (Montecucco et *al* 2007).

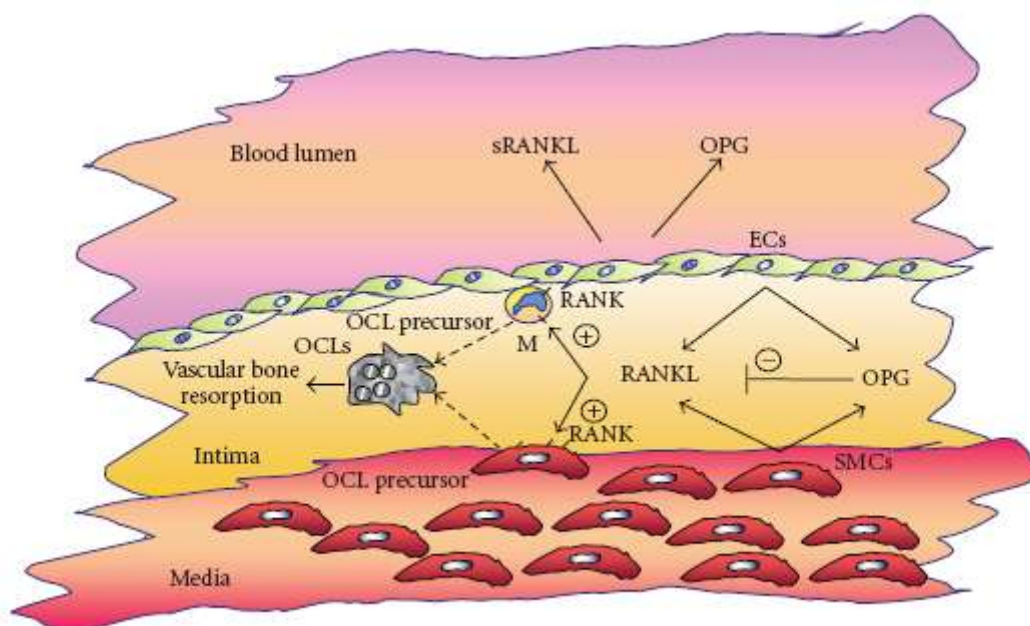


Figure 12 : Axe OPG/RANK/RANKL dans la calcification de la plaque athéromateuse : diagramme du modèle de différenciation ostéoclastique (Montecucco et *al.* 2007). Du RANKL soluble et de l'OPG sont sécrétés dans la plaque athéromateuse et dans le flux sanguin essentiellement par les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. RANKL promeut la différenciation des précurseurs ostéoclastiques (principalement les monocytes/macrophages (M), les cellules dendritiques et les cellules musculaires lisses) en ostéoclastes. L'OPG neutralise l'action de RANKL. La balance entre les deux molécules solubles régule la résorption osseuse dans la plaque calcifiée, élément corrélé à la rupture de plaque.

- **Le modèle passif physicochimique**

Ce modèle de calcification artérielle passive est décrit pour les calcifications de la média observées dans la sclérose de Mönckeberg (Mönckeberg et *al* 1903), l'hypervitaminose D (Mallick et *al* 1968), l'insuffisance rénale terminale (Foley et *al* 1998, Moe et *al* 2002), le diabète (Morrisson et *al* 1929, Chantelau et *al* 1997) et non pour les calcifications intimes qui caractérisent l'athérosclérose (Proudfoot et *al* 2001). Les patients présentant de telles calcifications ont des concentrations sériques de phosphore plus élevées et des produits ioniques calcium-phosphore également plus importants ($\text{Ca}^{2+} \times \text{PO}_4^{-3}$) (Goodman et *al* 2000).

c) Molécules impliquées dans la calcification artérielle

De nombreux médiateurs sont impliqués dans la régulation de la constitution et du devenir des calcifications artérielles (Tableau 2)

**Tableau 2 : Listes non exhaustives de médiateurs impliquées
dans les calcifications artérielles (d'après Rennenberg et *al* 2010)**

Protéines inhibitrices	Protéines activatrices
MGP	BMP-2
BMP	RANKL
OPG	
Fetuin-A	
OPN	

i. Molécules inhibitrices des calcifications artérielles

- **Matrix Gla Protein (MGP)**

La MGP est une protéine de 10 kDa vitamine K-dépendante découverte en 1983 par Price et collaborateurs (Price et *al* 1983). Elle est produite par les cellules musculaires lisses et les chondrocytes. Et est retrouvée sur les sites de calcifications. Sa production est augmentée en cas d'augmentation du taux de calcium in situ (Farzaneh-Far et *al* 2003). Il existe une forme active et une formes inactive en fonction de la carboxylation vitamine K dépendante (forme activée) de la protéine par la γ -glutamylcarboxylase. La MGP est connue pour réguler la Bone Morphogenic Protein de type 2 (BMP-2) mais elle peut aussi lier directement les cristaux de calcium dans la matrice artérielle prévenant ainsi le processus de calcification (Zebboudj et *al* 2002). Produite dans la matrice vasculaire, la MGP semble transportée dans le plasma en combinaison avec la Fetuin-A formant ainsi le complexe Fetuin-A-minéral (Price et *al* 2002, Price et *al*. 2003). Des manipulations in vivo ont montré que l'absence de MGP ou une diminution de la molécule (en bloquant l'action de la vitamine K par la coumarine) entraînait l'apparition de calcifications vasculaires (Luo et *al* 1997, Price et *al* 1998). Il existe un modèle humain de calcification excessive des artères de gros calibre : le syndrome de Keutel. Il s'agit d'un syndrome autosomique récessif caractérisé par un manque constitutif de MGP mature (Munroe et *al* 1999). Sur le plan thérapeutique, l'action de la MGP peut être modifiée par la prise de coumarine ou d'anti-vitamines K. (il en résulte une calcification vasculaire accrue) (Geleijnse et *al* 2004, Koos et *al* 2005, Schurgers et *al* 2004).

- ***Bone Morphogenetic Proteins***

Ce sont des membres de la superfamille du TGF- β . Elles jouent un rôle dans le maintien et la réparation de l'os et des autres tissus de l'adulte. Leur rôle dans les calcifications vasculaires reste complexe. Lorsque les cellules musculaires lisses changent leur phénotype contractile en phénotype synthétique, ils perdent leurs marqueurs musculaires lisses et entrent dans une phase de prolifération. Ils produisent alors des protéines de la matrice extracellulaire et deviennent des cellules OBLike. La perte des marqueurs musculaires lisses est influencée par les BMP : deux ont été largement étudiées la BMP-2 et la BMP-7. (Hruska et *al* 2005, Shao et *al* 2006). La BMP-2 est impliquée dans la minéralisation (cf paragraphe ci-dessous) et l'induction locale de l'inflammation. La BMP-7 semble retarder les calcifications vasculaires.

Si la BMP-2 est associée à une diminution des marqueurs musculaires lisses, la BMP-7 a un effet contraire (Rennenberg et *al* 2010). Le mécanisme d'action différente des deux molécules n'est pas encore bien connu. BMP-7 favorise la formation du tissu osseux et le dépôt de phosphate dans le tissu osseux. Elle prévient ainsi des taux sériques hauts de phosphate et des calcifications vasculaires. Dans l'insuffisance rénale chronique un certain niveau de BMP-7 peut faire diminuer les calcifications vasculaires. Cependant, chez ces patients, la BMP-7 (produite par le rein) est généralement basse (Mathew et *al* 2006). L'effet protecteur contre les calcifications de cette molécule pourrait être compromis entraînant une calcification excessive.

- ***Ostéoprotégérine (OPG)***

Comme nous l'avons déjà vu, l'OPG est produite par différents tissus et notamment par le système vasculaire. OPG est augmenté par les oestrogènes, le TGF- β et la BMP-2. Son taux sérique est diminué en d'augmentation du taux de PTH, de glucocorticoïdes, de prostaglandine E2, d'insulin-like growth factor-1 et d'immunosuppresseurs. Les calcifications vasculaires résultent de l'équilibre naturel entre l'OPG et RANKL tout comme le remodelage osseux (Figure 12). Une expression basse d'OPG conduit à une ostéoporose et des calcifications vasculaires, alors qu'une forte expression entraîne une ostéopétrose (Bucay et *al* 1998, Collin-Odosby et *al* 2004). Cliniquement, des taux sériques hauts d'OPG sont associés à l'athérosclérose ou des facteurs de risque de l'athérosclérose, indiquant un rôle compensateur de l'élévation du taux d'OPG en réponse à l'athérosclérose. Ainsi l'OPG pourrait diminuer les calcifications vasculaires (Collin-Odosby et *al* 2004, Knudsen et *al* 2003, Kazama et *al* 2002).

- ***Fetuin A***

La Fetuin-A est une glycoprotéine sérique produite dans le foie et présente à hautes concentrations dans le sérum (0,4-1 g/l) (Ketteler et al 2003). Son rôle a été largement étudié dans l'insuffisance rénale terminale. Cette molécule n'est pas dialysable avec un poids moléculaire de 56 kDa. Elle agit comme un agent négatif de la phase aigüe et comme un puissant inhibiteur de calcifications (Ketteler et al 2003, Schafer et al 2003, Lebreton et al 1979). Avec la MGP, la Fetuin-A est capable de réaliser un complexe avec le calcium et le phosphate qui transporte et élimine les sels insolubles de phosphate de calcium ; ce complexe prévient ainsi les dépôts calcaires dans les tissus extra-osseux (Coen et al. 2006). Les souris transgéniques Fetuin-A^{-/-} présentent des calcifications extra-squelettiques, des tissus mous et des artères péri-vertébrales (Schafer et al 2003).

Chez les patients dialysés, la Fetuin-A sérique est inversement proportionnelle avec le nombre de calcifications de l'artère coronaire (Moe et al 2005). Il a été démontré que des niveaux bas de Fetuin-A étaient associés avec un haut risque de mortalité liée ou non aux maladies cardiovasculaires (Ketteler M et al 2003, Stenvinkel et al 2005, Wang et al 2005). Cet effet est partiellement médié par l'inflammation, étant associé avec des taux sériques de C-Reactive Protein (CRP) importants.

- ***Ostéopontine (OPN)***

C'est une phospho-protéine acide extracellulaire. Les phosphosérines contenues dans l'OPN sont responsables de leur forte affinité pour l'hydroxyapatite. L'OPN est présente dans les tissus minéralisés comme l'os et les dents. Les souris invalidées pour l'OPN présentent des calcifications vasculaires (Speer et al 2002). L'OPN régule la minéralisation par deux voies : elle inhibe d'une part la croissance des cristaux d'apatite et d'autre part stimule la fonction ostéoclastique. Dans des artères normales, l'OPN est absente, alors qu'elle est abondamment présente dans la plaque calcifiée (Giachelli et al 2005).

- ***Pyrophosphate inorganique***

Le pyrophosphate est un inhibiteur potentiel de la calcification vasculaire. Il sert de substrat à la phosphatase alcaline (ALP). Ses niveaux sont maintenus par l'activité de la NPP1 (ecto Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1) et par l'ANK (Pyrophosphate

exporter ankyrin). Une déficience en NPP1 est associée avec une augmentation des calcifications vasculaires dans la calcification artérielle infantile idiopathique. D'autre part, une diminution de l'ANK potentialise la calcification vasculaire de type endochondral. Le rôle du phyrophosphate dans la calcification vasculaire se fait par l'inhibition physiochimique de la formation d'hydroxyapatite et en prévenant le dépôt du tissu calcifié (Rennenberg et al 2010).

ii. Protéines promotrices des calcifications artérielles

• **BMP-2**

L'expression de BMP-2 est retrouvée dans les myofibroblastes de l'adventice artériel et dans les cellules de la média. La production de BMP-2 dans la paroi du vaisseau peut être secondaire à un stress oxydatif, à une inflammation, à une hyperglycémie ou à un dépôt de lipides oxydés (Parhami et al 1997, Fukui et al 2003, Rifas et al 2003). L'expression de BMP-2 est sous la dépendance de facteurs de transcription ostéogéniques tels Msx2, Cbfa1 ou RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) et osterix. Ceux-ci stimulent la différenciation de cellules vasculaires multipotentes en cellules OBL. Ces cellules sont alors capables de produire de la matrice osseuse (ossification intra-membraneuse) (Hruska et al 2005, Ahrens et al 1993, Ghosh-Choudhury et al 2001). L'effet de BMP-2 sur la formation osseuse est suggéré par le fait qu'elle soit modulée par la MGP (Zebboudj et al 2003, Bostrom et al 2001). La diminution d'expression de MGP par les cellules musculaires lisses ou une MGP inactive pourrait inhiber l'action de la BMP-2 et donc être favorable à l'apparition de calcifications vasculaires. Dans ce contexte, l'activité de la BMP-2 est inhibée par Smad 6 qui contrôle les voies de signalisation du récepteur à la BMP2. L'expression du gène Smad 6 est limitée au tissu cardiaque et au système vasculaire. Son inactivation induit des calcifications vasculaires, seulement dans les zones où il est normalement exprimé, suggérant un rôle modulateur de la BMP-2. Ainsi, des souris *Smad6*^{-/-} présentent des calcifications vasculaires extensives de toutes les couches constitutives des vaisseaux ainsi qu'une métaplasie chondroïde de l'aorte (Galvin et al 2000).

• **RANKL**

Comme nous l'avons déjà vu, RANKL se lie à RANK, transmembranaire récepteur, présent sur les ostéoclastes et ses précurseurs. L'action de RANKL peut être bloquée par

l'OPG, inhibiteur de la calcification vasculaire. Rappelons que RANKL est augmentée par la 1 α 25-dihydroxyvitamine D3, la PTH, les glucocorticoïdes, la prostaglandine E2, l'interleukine 1 α , le TNF- α , l'interleukine-6, l'interleukine-11, l'interleukine-17, le calcium et les immunosuppresseurs comme la cyclosporine A. Le RANKL est réduit par TGF- β (Hofbauer et *al* 2001, Sattler et *al* 2004, Hofbauer et *al* 2004, Schoppet et *al* 2002). Son implication suspectée dans le processus de calcification vasculaire est résumée dans la Figure 12.

- ***Hormone Parathyroïdienne (PTH)***

Cette hormone de 84 acides aminés synthétisée par les glandes parathyroïdes est la principale hormone responsable de l'homéostasie calcique. En effet, elle agit à plusieurs niveaux, pour augmenter la concentration plasmatique du calcium. Ainsi, sur le tissu osseux, la PTH stimule la résorption osseuse en particulier par activation des ostéoclastes *via* la production de RANKL par les ostéoblastes (Qin et *al* 2004). Sur le rein, la PTH provoque l'excrétion urinaire de phosphore inorganique et la réabsorption des ions calcium. Enfin, elle augmente l'absorption intestinale de calcium et de phosphore (Poole et *al* 2005). Au niveau du système vasculaire, la PTH prévient les calcifications des CML en inhibant l'activité phosphatase alcaline. (Jono et *al* 1998).

- ***Vitamine D***

Cette vitamine est synthétisée par la peau sous l'influence du soleil (rayonnements UVB) ou peut être administrée par voie orale. La provitamine D subit alors une hydroxylation hépatique qui donne naissance au calcidiol (ou 25-hydroxyvitamine D) ou une hydroxylation rénale qui aboutit au calcitriol (1,25-dihydroxy vitamin D), la forme active de la vitamine D. La synthèse du calcitriol rénal est sous le contrôle de la PTH. Dans la circulation sanguine, le calcidiol et le calcitriol sont liés à la DBP (vitamine D Binding Protein) (Zittermann et *al* 2007). Des récepteurs à la vitamine D ont été mis en évidence dans de nombreuses cellules parmi lesquelles les cellules musculaires lisses, les cardiomyocytes et les cellules endothéliales (Towler et *al* 2005). Le traitement de l'hyperparathyroïdie secondaire par le calcitriol peut exacerber les calcifications vasculaires dystrophiques. La toxicité à la vitamine D est un modèle usuel animal d'induction de calcifications vasculaires (Norman et *al* 2005).

La figure 13 résume le rôle des principaux médiateurs de la formation des calcifications vasculaires décrits ci-dessus.

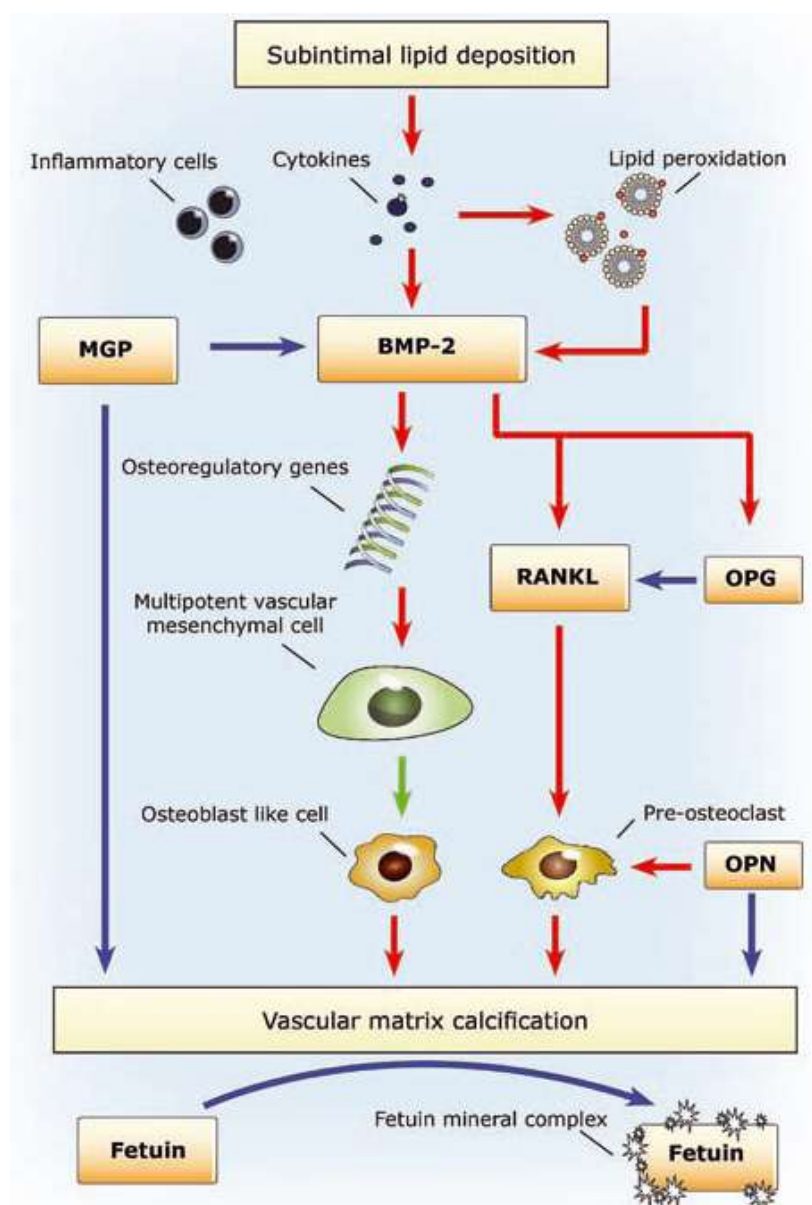


Figure 13 : Les différentes protéines impliquées dans les calcifications artérielles (Rennenberg et al 2010). Les flèches bleues indiquent un effet inhibiteur sur la calcification artérielle. Les flèches rouges indiquent un effet stimulant. La production de calcifications résulte d'un déséquilibre entre ces différentes molécules. Le premier évènement du processus est l'atteinte endothéliale qui permet le dépôt de lipides en sous-intimal. La réponse inflammatoire qui s'en suit induit la production de BMP-2. Si cela n'est pas contrebalancé par la MGP active (carboxylée), les cellules vasculaires mésenchymateuses sont alors stimulées pour se différencier en cellules ostéoblaste-like. L'intervention de l'ostéopontine, de l'OPG et de RANKL influence le niveau de calcifications.

IV. Objectifs de la thèse

Actuellement, il est bien reconnu que l'homéostasie du tissu osseux est régulée en grande partie par la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL. En matière de pathologie tumorale, la dérégulation de cette triade moléculaire est responsable de l'ostéolyse associée aux tumeurs malignes et à leur développement en site osseux. Cette triade moléculaire OPG/RANK/RANKL exerce, outre son implication dans le remodelage osseux, une activité dans les systèmes immunitaire et vasculaire expliquant ainsi son importance en immunologie, en pathologie osseuse et vasculaire.

Cette thèse a pour objectifs d'approfondir les rôles de cette triade moléculaire en physiopathologie et notamment en pathologie vasculaire, plus spécifiquement dans la genèse des calcifications artérielles au cours de l'athérosclérose. Au cours de celle-ci, la survenue de calcifications est fréquente et de mauvais pronostic, indépendamment de l'âge qui naturellement augmente le risque de calcifications artérielles (Iribarren et *al* 2000). Ces calcifications augmentent la dureté de la paroi artérielle et contribuent ainsi à l'hypertension artérielle systolique, à l'hypertrophie ventriculaire gauche, à l'ischémie et à l'insuffisance cardiaque (Rennenberg et *al* 2010). Des travaux récents ont montré que le changement des propriétés mécaniques de la plaque athéromateuse associé à l'infiltrat inflammatoire secondaire aux calcifications pouvait augmenter le risque de rupture de plaque et donc de complications vasculaires (thrombose, embolie, ischémie...) (Iribarren et *al* 2000, Vengrenyuk et *al* 2006, Ehara et *al* 2004).

En France, le traitement endovasculaire représente actuellement 35% des gestes de revascularisation artérielle périphérique et sa part ne cesse de croître. L'angioplastie au ballonnet et l'implantation d'un stent sont les principales techniques endovasculaires utilisées. Cependant, les résultats du traitement endovasculaire sont limités par la survenue de resténose liée à l'hyperplasie intimale. La survenue de resténose varie chez un même patient selon la topographie artérielle suggérant une hétérogénéité des lésions selon leur localisation.

Les buts de cette thèse a été :

- 1) de caractériser sur le plan morphologique les plaques athéromateuses selon leur localisation (et plus spécifiquement carotide/fémorale) et de rechercher une différence de calcifications suivant le lit artériel

- 2) d'étudier le rôle des molécules impliquées dans la différenciation ostéoclastique et dans la biologie de la cellule endothéliale : OPG/RANK/RANKL

Pour ce faire, un travail collaboratif a été initié en 2008 au CHU de Nantes entre les services de Chirurgie vasculaire (Dr Y Gouëffic), de Neurologie (Dr F Hérisson), d'Endocrinologie (Pr M Krempf), le service d'Anatomie Pathologique (Dr MF Heymann) et le laboratoire INSERM U957 (Pr D Heymann). Durant un an, une biocollection de tissus et de prélèvements sanguins a été organisée pour les patients opérés d'endartériectomie fémorale et carotidienne. Cela a permis d'analyser comparativement les pièces d'endartériectomie fémorale et carotidienne (en particulier analyse anatomopathologique et des composantes minérale et lipidique) et de comparer les données cliniques et biologiques des patients.

Partie I : Athérosclérose et calcifications artérielles

I. Introduction :

Les pathologies cardiovasculaires représentent pour les pays industrialisés des coûts médico-économiques importants en terme de santé publique. Elles sont responsables d'évènements cardiovasculaires aigus voire même de décès. L'athérosclérose est une des pathologies cardiovasculaires les plus répandues dont les répercussions cliniques sont très variables (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, embolie, thrombose, etc...). Elle touche préférentiellement les artères coronaires, carotides, l'aorte ainsi que les artères des membres inférieurs. Elle atteint souvent plusieurs territoires de façon synchrone. Le taux de morbidité et mortalité est alors augmenté (Sabouret et *al* 2008). Un certain nombre de facteurs de risque sont connus pour accélérer les lésions vasculaires et les calcifications associées : l'âge, le tabagisme, l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, la surcharge pondérale, le diabète et les antécédents familiaux.

1. Rappel histologique

La paroi artérielle normale est constituée de trois couches caractéristiques (Figure 14) qui sont, de dedans en dehors :

- L'**intima** comportant un endothélium de cellules pavimenteuses et une couche subendothéliale correspondant à du tissu conjonctif lâche
- La **média** formée de cellules musculaires lisses orientées de façon circulaire et de matrice extracellulaire
- L'**adventice** formée de tissu conjonctif propre

Les frontières entre intima et média et entre média et adventice peuvent être marquées par la présence de lamelles élastiques (**lames** ou **limitantes élastiques interne et externe**). Des plus grosses artères jusqu'aux plus petites, on observe une graduation continue des caractéristiques de la paroi. Les artères sont classées en (1) **artères élastiques** (artères de conduction), (2) **artères musculaires** (artères de distribution) et (3) **artérioles**, en fonction de leur diamètre, de leur épaisseur et du composant prédominant de leur média. Cette classification n'est pas

toujours aisée, certaines artères étant à cheval sur le plan histologique entre une artère élastique et une artère musculaire (Fawcett et *al* 2002).

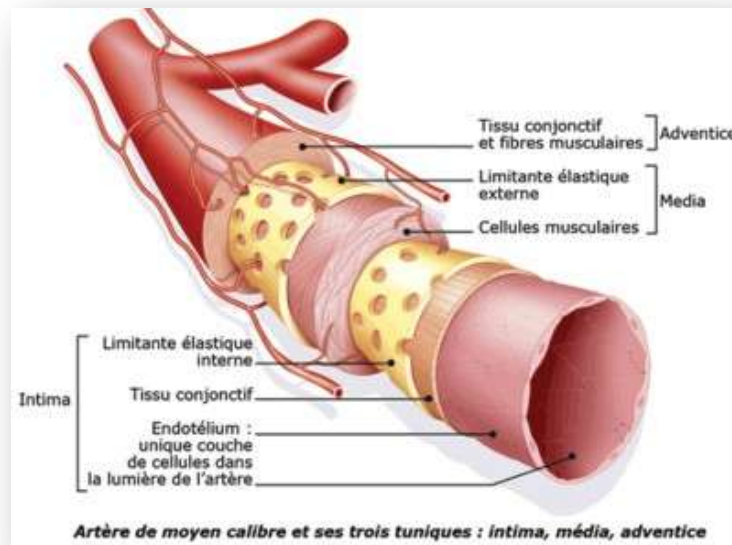


Figure 14 : Schéma d'une paroi artérielle normale

2. Athérome : une maladie inflammatoire

a) Quelques définitions

Le terme d'**athérosclérose** vient du grec *athere* (bouillie) et *scleros* (dur). L'athérosclérose est définie selon l'OMS (définition n'ayant pas changé depuis 1957 !!!) comme l'association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et de moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calciques, le tout s'accompagnant de modifications de la média (campus d'Anatomie Pathologique). L'**athérome** ne représente qu'une des lésions élémentaires de l'athérosclérose (cf Classification de l'AHA ci-dessous).

b) Histoire naturelle de la plaque

L'histoire naturelle de l'athérosclérose (Figure 15) débute par la formation de lésions précoces appelées stries lipidiques, visibles chez le jeune adulte. Le processus pathologique se poursuit jusqu'à la formation d'une plaque athéromateuse fibro-lipidique. Celle-ci est définie par l'accumulation intimale de cellules musculaires lisses (CML) formant une chape fibreuse,

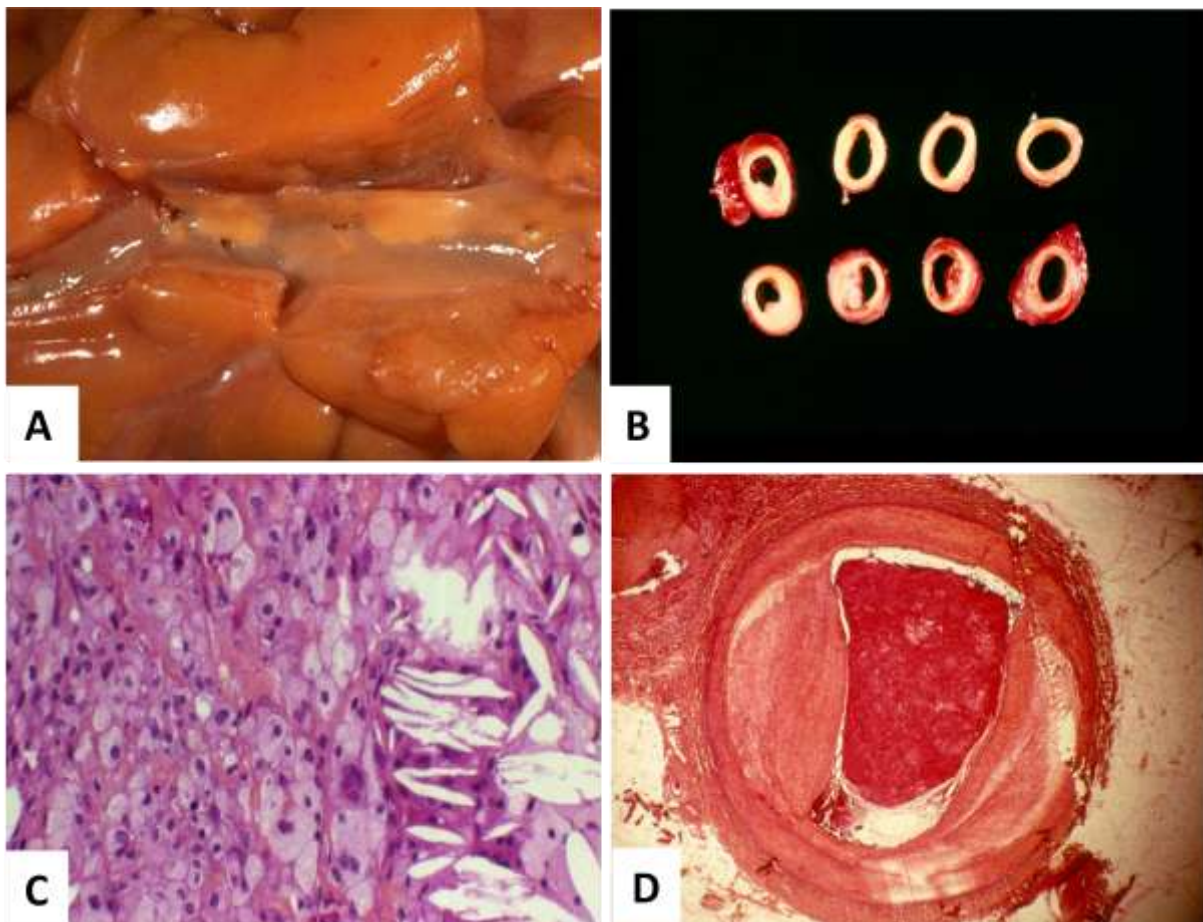


Figure 15 : Histoire naturelle de la plaque athéromateuse

- A) Strie lipidique
- B) Plaque athéromateuse intimale avec atteinte segmentaire
- C) Bouillie athéromateuse (macrophages spumeux à gauche, cristaux de cholestérol à droite)
- D) Thrombus obstruant la lumière artérielle

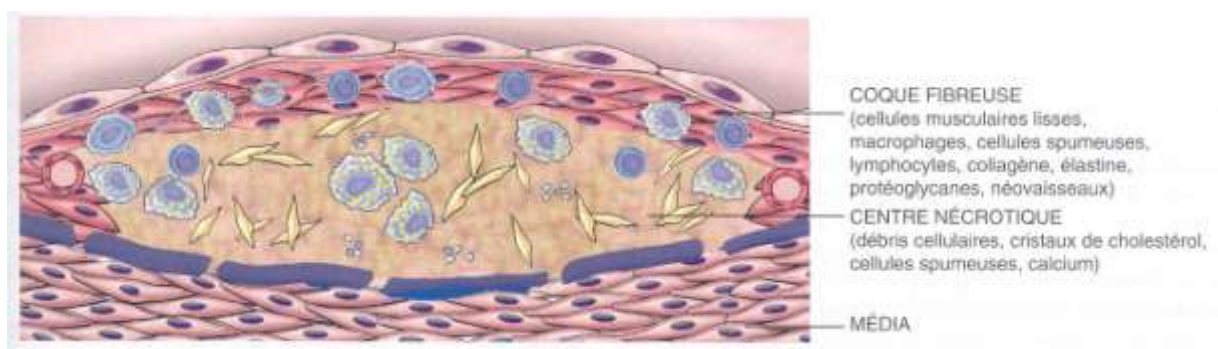


Figure 16 : Schéma d'une plaque athéromateuse (Robbins et al 2010)

en association à des dépôts de lipidiques (LDL, cholestérol) et des macrophages spumeux : le cœur lipidique ou bouillie athéromateuse (Figure 16). Il s'en suit un rétrécissement de la lumière, ou sténose, ce qui entraîne une diminution de l'irrigation, ou hypoxie, du tissu correspondant. Un thrombus peut se former sur la plaque suite à la lésion endothéliale. Lorsque l'obstruction de la lumière du vaisseau est complète, survient une ischémie responsable de l'infarctus des tissus (nécrose) répondant à l'artère touchée.

Le comité international de l'AHA (American Heart Association) a proposé dans les années 1990 une classification reprenant les différents stades histopathologiques de la plaque athéromateuse. Une modification de cette classification a été proposée en 2000 (Dalager et *al* 2007) (Tableau 3, page suivante).

c) Physiopathologie

Depuis Russel Ross (Figure 17), l'athérosclérose est considérée comme une réponse inflammatoire de la paroi artérielle à une agression. Les premiers signes apparaissent dès les lésions initiales, appelées stries lipidiques. L'étape la plus précoce du processus lésionnel siège au niveau de l'endothélium. Suite à une agression, l'endothélium perd ses propriétés physiologiques (dysfonction endothéliale), devenant procoagulant (agrégation de plaquettes), exprimant des molécules d'adhésion et permettant l'influx de lipides, les LDL (Low Density Lipoprotein). Dans la paroi, les LDL sont oxydés puis internalisés par les macrophages, devenant des cellules spumeuses, gorgées de vésicules lipidiques. Ces cellules spumeuses exercent un effet chimiotactique entraînant la migration de leucocytes dans la plaque. Cette réponse inflammatoire provoque la migration et la différenciation des cellules musculaires lisses au sein de l'intima. Ces dernières perdent alors leur phénotype contractile pour acquérir un phénotype synthétique produisant de la matrice extracellulaire, ceci conduisant à la fibrose. En parallèle, débute la formation de néovaisseaux ou angiogenèse intraplaque. Outre l'accumulation de matériel lipidique et la prolifération des CML, l'athérosclérose est caractérisée par une forte implication immunitaire : les leucocytes et les cytokines inflammatoires jouent un rôle déterminant dans la genèse des lésions athéromateuses et dans leur progression faisant de l'athérosclérose une maladie inflammatoire à part entière (Ross et *al* 1999, Ait Oufella et *al* 2011).

Tableau 3 : Classification modifiée de l'AHA (Dalager et al 2007)

Stade	Nom	Caractéristiques histologiques	Définition
0	Intima normale ou épaissie	Pas de cellule spumeuse	Pas de cellule spumeuse. Epaississement intimal possible ou infiltration lymphocytaire
I	Lésions avec cellules spumeuses (Xanthome intimal)	Cellules spumeuses isolées	Cellules spumeuses isolées
II	Lésions avec cellules spumeuses (Xanthome intimal)	Couches de cellules spumeuses	Couches de cellules spumeuses (≥ 2 couches)
III	Lésion intermédiaire (épaississement intimal pathologique)	Lipides extracellulaires avec peu ou pas de cristaux de cholestérol	Accumulation mineure de structure ou de matériel non coloré remplaçant la structure normale de l'intima
IV	Plaque avec cœur lipidique (fibrous plaque atheroma)	Cœur lipidique extracellulaire ou bouillie athéromateuse	Cavité non colorée sans matrice extracellulaire, contenant des cristaux de cholestérol
V	Plaque avec cœur lipidique (fibrous plaque atheroma)	Cœur lipidique extracellulaire + fibrose	+ hyalinisation (fibres biréfringentes)
VI	Plaque compliquée	Ulcération, hématome ou thrombose	Défect de surface, plaque hémorragique ou thrombus luminal
VII	Plaque calcifiée (plaque fibrocalcique)	$\geq 50\%$ de la plaque est calcifiée	$\geq 50\%$ de la plaque est calcifiée avec ou sans cœur lipidique
VIII	Plaque fibreuse (plaque fibrocalcique)	Plaque fibreuse sans cœur lipidique	Plaque fibreuse avec hyalinisation sans cœur lipidique (ou celui-ci totalement calcifié)
IX	Occlusion chronique (occlusion totale)	Artère occluse de façon occluse	Artère occluse par plaque et tissu conjonctif, sans thrombus récent

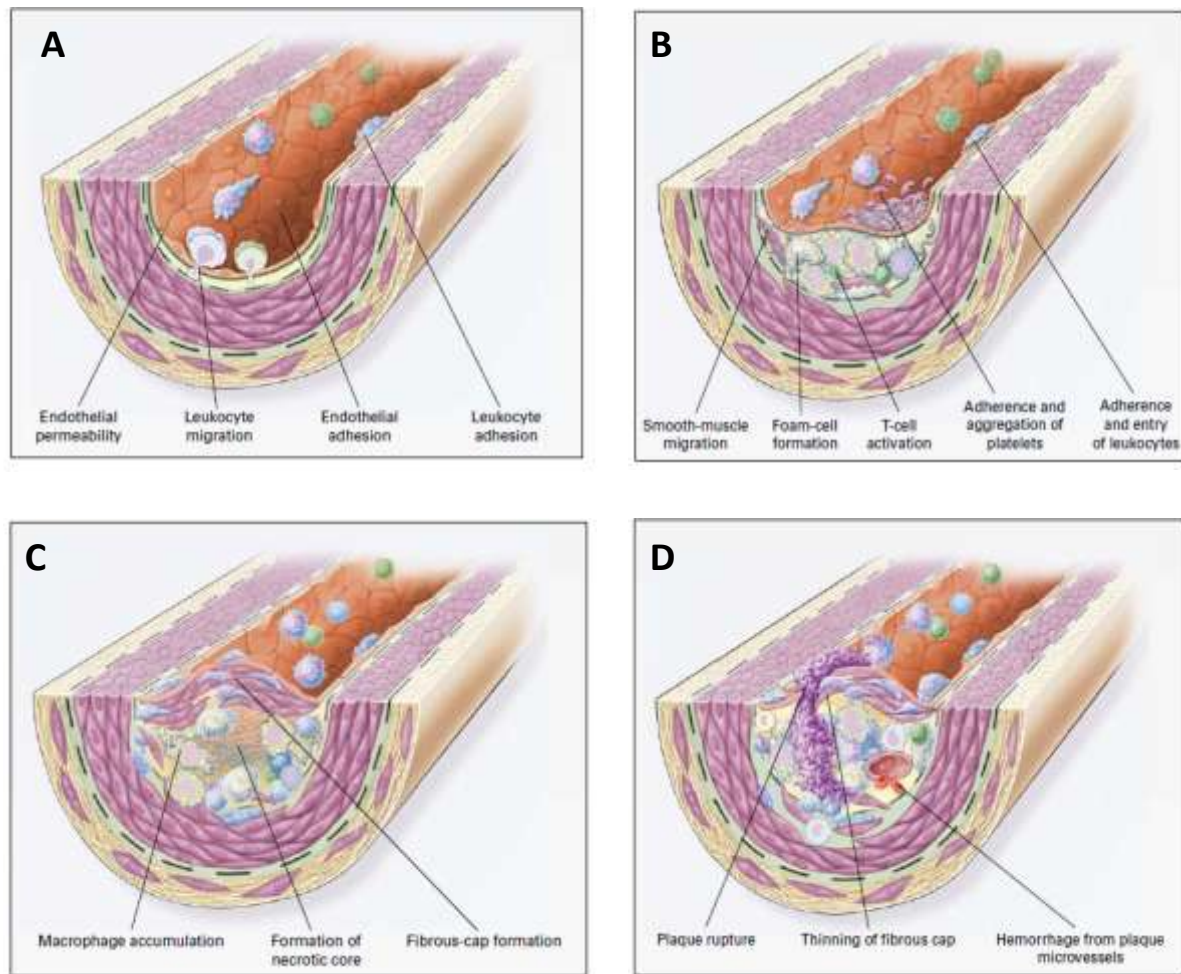


Figure 17 : Les différentes étapes de l'athérogénèse (Ross et al. 1999). (A) : dysfonction endothéliale (B) : strie lipidique (C) : lésion avancée avec formation de la chape fibreuse (D) : plaque instable compliquée avec rupture

d) Notion de plaque instable

Les manifestations cliniques en lien avec l'athérome sont le fait de complications aiguës ou chroniques de la plaques athéromateuse. En effet, une plaque dite instable ou vulnérable peut brutalement se compliquer, s'ulcérer, provoquant ainsi une thrombose et/ des embolies. Les plaques instables sont caractérisées par une chape fibreuse fine (thin-cap fibrous atheroma ou TCFA en anglais) mesurant moins de 65µm, infiltrée de macrophages, de lymphocytes, et siège d'une néovascularisation ; les CML sont peu nombreuses voire absentes. Le cœur lipidique est de grande taille (Finn et al 2010). La plaque instable se différencie de la plaque compliquée ou rompue par un cœur lipidique statistiquement plus petit, un infiltrat macrophagique moins abondant dans la chape fibreuse et moins de

calcifications. La quantité de macrophages chargés d'hémosidérine est également moins important (Virmani et *al* 2006).

3. Artériopathie périphérique et athérome

L'artériopathie périphérique est la résultante d'un ensemble de mécanismes pathologiques conduisant au rétrécissement du calibre artériel (sténose) ou à sa dilatation (anévrisme). Le caractère périphérique fait référence à l'aorte et ses branches à l'exclusion des artères coronaires. L'artériopathie périphérique représente un véritable problème de santé publique, touchant de 3 à 10% de la population dans les pays occidentaux et jusqu'à 15% de la population âgée de plus de 70 ans. Elle est la principale cause d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) et d'amputation conduisant à une détérioration majeure de la qualité de vie et de l'autonomie. De plus, l'artériopathie périphérique est reconnue comme marqueur de gravité de la maladie athéromateuse. Récemment l'étude BASIL, a montré que plus de 50% des patients présentant une ischémie critique des membres inférieurs étaient décédés à trois ans. La principale étiologie d'artériopathie périphérique est l'athérosclérose. Sa physiopathologie et ses facteurs de risques sont les mêmes que se soit au niveau coronaire ou au niveau périphérique. En raison de la forte prévalence de la coronaropathie, les efforts de recherche ont longtemps porté sur l'étude des coronaires et il existe encore peu de données spécifiques à l'artériopathie périphérique.

4. Projet ECLA : Etude Comparative des Lésions Athéromateuses

En France, le traitement endovasculaire représente actuellement 35% des gestes de revascularisation artérielle périphérique et sa part ne cesse de croître. L'angioplastie au ballonnet et l'implantation d'une endoprothèse métallique (stent) sont les principales techniques endovasculaires utilisées. Cependant, les résultats du traitement endovasculaire sont limités par la survenue de resténose. Cette resténose varie chez un même patient selon la topographie artérielle suggérant une hétérogénéité des lésions selon leur localisation. Par exemple, la fréquence de resténose à un an après angioplastie au ballonnet associée ou non à l'implantation d'une endoprothèse métallique (stent) est de 6 à 9 % au niveau carotidien et entre 30-40% au niveau fémoral superficiel (Lal et *al* 2003, Schillinger et *al* 2006). La cinétique de resténose est également différente selon le lit artériel. En effet, le taux de resténose maximum serait de atteint au bout de six mois pour les artères coronaires (Kastrati

et *al* 1993) alors que le plateau de resténose se situe à 12 mois pour les artères fémorales (Schillinger et *al* 2007). Enfin, le lit artériel traité a un impact sur l'effet des stents actifs. En 2001, Morice et collaborateurs rapportaient une absence totale de resténose coronaire 9 mois après l'implantation d'un stent actif (Morice et *al* 2002). Jusqu'à peu de temps, les stents actifs n'avaient pas fait preuve de leur efficacité pour réduire la resténose intra-stent dans les artères périphériques. Toutefois, Lammer et collaborateurs ont montré récemment l'efficacité du stent autoexpansif Dynalink nitinol (Abott Laboratoires) associé à l'everolimus (drogue anti-proliférative) sur la resténose de l'artère fémorale (Lammer et *al* 2011).

C'est dans ce contexte qu'a été élaboré le projet ECLA (Etude Comparative des Lésions Athéromateuses) visant à comparer sur le plan histologique des pièces d'endartériectomie carotidiennes et fémorales humaines, travail encore non réalisé à notre connaissance.

Les objectifs du projet étaient de :

- a) caractériser les plaques athéromateuses selon leur localisation, avec analyse comparative des composantes minérales et lipidiques
- b) comparer les données cliniques, biologiques des patients

Pour ce faire, entre février 2008 et février 2009, il a été réalisé une biocollection de plaques athéromateuses à partir de pièces d'endartériectomie fémorale et carotidienne. Les patients étaient tous âgés de plus de 18 ans. Les plaques carotidiennes étaient opérées à un stade de sténose serrée (>70%) de novo de la bifurcation, symptomatique ou asymptomatique. Les plaques fémorales correspondaient à des lésions symptomatiques du trépied fémoral (stade 3, 4, 5 et 6 de la classification de Ruhterford).

Pour chaque patient, les données cliniques étaient collectées, et des prélèvements sanguins réalisés (notamment bilan phospho-calcique et lipidique). Sur le plan histologique, les plaques ont été typées selon la classification AHA et avec étude comparative des composantes minérale et lipidique. Enfin, un dosage de la teneur en cholestérol des plaques a été réalisé. A terme, la perspective de cette étude était de mieux définir les indications, les techniques et les résultats du traitement endovasculaire selon la topographie lésionnelle et la nature de la plaque athéromateuse

II. Article 1

Herisson F*, Heymann MF*, Chétiveaux M, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, Rouillon T, Krempf M, Lemarchand P, Heymann D, Gouëffic Y.

Carotid and femoral atherosclerosis plaques show different morphology. *Atherosclerosis* 2011, 216: 348-354.

* Contribution identique

Les résultats de l'endartériectomie varie en fonction du site artériel incriminé (voir paragraphe ci-dessus). Le but de ce travail était de montrer que ces différences de résultats pouvaient être en relation avec la structure histologique de la plaque athéromateuse, en s'appuyant sur une étude prospective avec analyse histologique comparative. Une biocollection de pièces d'endartériectomie prélevées au niveau fémoral et carotidien a été réalisée avec données démographiques et prélèvements sanguins associés. Cette étude a rassemblé 45 plaques carotidiennes et 43 plaques fémorales. Aucune différence sur le plan démographique (âge, sexe, risques cardiovasculaires, maladie coronaire, insuffisance rénale, prise de statines ou de traitement anticoagulant) et biologique notamment sur le bilan lipidique et phosphocalcique n'a été notée entre les deux groupes. Exception faite, le taux de vitamine D était plus bas pour les patients avec endartériectomie fémorale ($p < 0.05$). En ce qui concerne les résultats morphologiques, les plaques carotidiennes étaient plus fréquemment fibrolipidiques (stades IV et V de l'AHA) et ceci dans 75% des cas alors que les plaques fémorales étaient plus fibrocalcaires (stades VII et VIII de l'AHA) dans 93%. Cette différence était statistiquement significative avec $p < 0.001$. A sein des plaques, quatre types de calcifications ont été observées : le type lamellaire, nodulaire, à centre clair et de la métaplasie ostéoïde. Les calcifications lamellaires et nodulaires étaient plus fréquentes pour les plaques fémorales (86% versus 62% et 84% versus 58%) comparées aux carotides. Le type à centre clair était observé de façon équivalente au niveau des deux sites. Les plaques fémorales présentaient plus fréquemment de la métaplasie ostéoïde (63% versus 20%). Sur le plan de l'infiltrat inflammatoire, les plaques carotidiennes présentaient un infiltrat inflammatoire riche en macrophages (CD68+), plus abondant que les plaques fémorales : en effet, le pourcentage moyen de macrophages au sein des plaques carotidiennes était de $15.2 \pm 3.14\%$ versus $6.13 \pm 2.2\%$ ($p < 0.05$). Les analyses biochimiques des plaques étaient en accord avec les résultats histologiques : les plaques fémorales comportaient plus de calcium et moins de cholestérol que les plaques carotidiennes.

En conclusion, les plaques athéromateuses carotidiennes et fémorales montrent un aspect morphologique et une composition biochimique différents (plus de calcifications pour les fémorales et plus de lipides et d'infiltrat inflammatoire macrophagique pour les carotides).



Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology[☆]

Fanny Herisson^{a,b,c,1}, Marie-Françoise Heymann^{a,b,d,1}, Maud Chétiveaux^{b,g}, Céline Charrier^{a,b}, Séverine Battaglia^{a,b}, Paul Pilet^{b,e}, Thierry Rouillon^{b,e}, Michel Krempf^{b,f,g}, Patricia Lemarchand^{b,g,h}, Dominique Heymann^{a,b}, Yann Gouëffic^{b,f,g,h,i,*}

^a INSERM, U957, Nantes F-44000, France

^b Université de Nantes, Nantes F-44000, France

^c CHU de Nantes, Service de neurologie, Nantes F-44000, France

^d CHU Nantes, Service d'anatomopathologie, Nantes F-44000, France

^e INSERM U791, F-44000, France

^f CHU Nantes, l'institut du thorax, Service d'endocrinologie, Nantes F-44000, France

^g INSERM, U915, Nantes F-44000, France

^h CHU Nantes, l'institut du thorax, Centre d'investigation clinique, Nantes F-44000, France

ⁱ CHU Nantes, l'institut du thorax, Service de chirurgie vasculaire, Nantes F-44000, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2010

Received in revised form 23 January 2011

Accepted 3 February 2011

Available online 1 March 2011

Keywords:

Peripheral artery disease

Atherosclerosis

Vascular calcification

Lipids

ABSTRACT

Objective: Results of endovascular repair vary according to the arterial bed. We hypothesized that these differences may be related to the plaque features. To explore this hypothesis, we designed a prospective study that compared carotid and femoral atheroma.

Methods and results: Patients that underwent femoral or carotid endarterectomy were included in our study. Demographic data and blood sampling were obtained prior to surgery. Plaques were evaluated for AHA grading, calcification and lipid content. Eighty-eight plaques were harvested during this study (45 carotid specimens and 43 femoral specimens). No differences were noted between carotid and femoral groups regarding demographic and biological data. Histological data more frequently showed fibrous cap atheroma in carotid arteries (75%) and fibrocalcific plaques in femoral arteries (93%), $p < 0.001$. Morphological analyses showed a high prevalence of osteoid metaplasia in femoral arteries (63%) compared to carotid arteries (20%, $p < 0.001$). Biochemical analyses were consistent with histological data, showing higher calcium and lesser cholesterol concentrations in femoral than in carotid plaques ($p < 0.01$).

Conclusions: Femoral and carotid plaques showed different morphology in comparable groups of patients.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The definition of peripheral arterial disease (PAD) broadens towards a diverse group of disorders that lead to narrowing of supra-aortic trunks, aorta, upper and lower extremities arteries, and visceral arteries. PAD is a highly prevalent public health problem and is related to atherosclerosis. PAD has been classified as a coronary artery disease equivalent, meaning that patients with a diagnosis of PAD carry a risk for major coronary events equal to established coronary artery disease [1]. Given the high prevalence

of coronary disease, research has focused for a long time on coronary arteries and little is known about the specificities of PAD.

Currently, more and more studies show different results after endovascular treatment of PAD according to the arterial bed. For instance, in-stent restenosis rates differ according to the arterial bed. In-stent restenosis following carotid stenting is reported to occur in less than 10% of cases [2], whereas it occurs in up to 40% of superficial femoral artery cases [3]. In-stent restenosis following coronary stenting is reported to be in the range of 10–15% [4]. However, stenting of lower extremities arteries is not as effective as stenting of coronary arteries since high rates of restenosis are observed in the range of 30–50% [5]. Moreover, the efficacy of drug eluting stents (DES) differs according to the arterial bed. In 2001, Morice et al. reported 0% of coronary in-stent restenosis at 9 months [6]. For peripheral arteries, DES have not shown to decrease in-stent restenosis in comparison to bare metal stents [7].

Even if numerous factors such as the hemodynamic factors, the length of the lesion, the run-off could alter the restenosis rate, some

[☆] Funding sources: This study was supported by grant from La Fondation de L'Avenir (ET7-477).

* Corresponding author at: Department of Vascular Surgery, Institut du Thorax, Hôpital Guillaume et René Laënnec, Bd J. Monod, St Herblain, 44093 Nantes Cedex 1, France. Tel.: +33 2 40 16 50 93; fax: +33 2 40 16 50 81.

E-mail address: yann.goueffic@chu-nantes.fr (Y. Gouëffic).

¹ These authors contributed equally to this work.

studies have shown that the nature of the atheromatous plaque could be also a crucial factor of in-stent restenosis [8,9]. For example, different studies have observed by intravascular ultrasound that soft atheromatous plaques are associated with a higher risk of in-stent restenosis [10]. However, these studies did not identify the components of the plaque. Few studies have characterized atheromatous plaques according to the arterial bed. Some studies used non-invasive arterial assessment to evaluate calcification according to the arterial bed. CT scan for arterial calcium assessment is a non-invasive way of obtaining information about the presence, location and extent of calcified plaques in the arteries [11,12]. These studies have shown that calcification increases in older patients and varies according to each arterial bed. Furthermore, histopathological studies have noted the presence of osteoid metaplasia in a range of 9–13% of carotid plaques [13].

To our knowledge, no previous study has compared advanced atherosclerotic lesions between different types of peripheral arteries. This study was designed to test the hypothesis of the existence of heterogeneity of atheroma expression among peripheral arteries such as carotid and femoral arteries.

2. Materials and methods

2.1. Patients

From February 2008 to June 2009, atheromatous plaques were harvested from patients undergoing carotid or femoral endarterectomy at the department of vascular surgery of the Nantes University Hospital. Patients suffering from non-atherosclerotic peripheral arterial disease, thrombosis or restenosis, and patients who could not give their written consent were excluded. Demographic and clinical data were collected, including age, gender, treatment, cardiovascular risk factors, the presence of coronary artery disease or renal failure was documented. Prior to surgery, blood specimens were collected for lipid balance and phospho-calcic metabolism. Sample collection and handling was performed in accordance with the guidelines of the Medical and Ethical Committee in Nantes, France, and a written informed consent was requested for each patient.

2.2. Tissue sampling

Endarteriectomies were performed on a consecutive series of patients using conventional surgical techniques. The plaque was removed at the bifurcation from within the lumen as a single specimen. All plaques were divided into 4 equal parallel sections. One part was processed for histological analysis, one section for scanning electron microscopy, and the last sections for lipid and calcium quantitative measurements.

2.3. Histology processing

Atherosclerotic plaques were immediately fixed in 10% formalin overnight and decalcified in Sakura TDE 30 fluid during 24 h. They were embedded in paraffin. Sections (4 μ m thickness) were stained with hematoxylin eosin (HE) added with safran. Lipid staining was obtained with Oil Red O for esterified lipids and filipin (filipin complex, F9765, Sigma–Aldrich, Poole, UK) for non-esterified lipids on frozen sections of 4 μ m as described by Kruth [14].

2.4. Histological grade of the atherosclerotic plaque

The sections were graded according to a slightly modified AHA classification [15]. Modified AHA classification is based on the 9 categories, of which 6 correspond to atheromatous plaques, type IX specimen (occlusion) were excluded from the study. Briefly

these categories include fibrous cap atheroma (type IV), fibrous cap atheroma associated with fibrosis (type V), fibrocalcific plaque with more than 50% of plaque area calcified (type VII), fibrocalcific plaque that is mainly fibrous without a lipid core (type VIII). Complicated plaques (type VI) were not taken into account since we were interested by rating the underlying plaque [15,16]. Inflammatory status of the plaque was determined semi quantitatively by the average number of macrophages stained by CD68 per mm² in the most representative part of the plaque and the percentage of CD68 stained area within the entire plaque.

2.5. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on adjacent deparaffinized sections. Sections were incubated with 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase and the non specific bindings were blocked in 4% bovine serum albumin. Monoclonal antibodies directed against (1) CD68, a marker of macrophages (dilution 1/60; 2165 Immunotech, Marseille France); (2) CD31, a marker of endothelial cells (dilution 1/20; M823, Dako Ltd., Ely, UK); (3) smooth muscle-actin (prediluted, A2547, Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Biotinylated polyclonal anti-mouse secondary antibody and peroxidase-conjugated streptavidin were applied for 1 h each with the use of the extravidine peroxidase for 30 min and then revealed with an AEC staining kit (Sigma–Aldrich). Preparations were counterstained with HE. A negative control was analyzed using a similar procedure excluding the primary antibody.

2.6. Quantitative measurements of calcium and lipids within the plaque

Exact amounts of tissue samples, 30–50 mg each, were carefully weighed, 5- α cholestane added for internal marker, homogenized with chloroform/methanol (2:1), and the homogenate was extracted two times with the mixture. The extract was evaporated and was saponified 1 h at 70 °C. Sterols were extracted with cyclohexane. After evaporation, sterol fractions were silylated. Cholesterol was quantitated with gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The values are given as mg/g of tissue. For analysis of calcium, 50 samples were first dehydrated. After carbonization (550 °C, 12 h) ashes were dissolved in 1 ml of nitric acid and then 24 ml of 1% lanthanum oxide (LaCl₃). Calcium absorbance was then determined by atomic absorption spectroscopy at 422.7 nm using a calcium lamp (Unicam Solaar 989 Atomic Absorption Spectrometer, Cambridge, UK) and compared to a standard curve constructed using known dilutions of a solution of 1000 μ g/ml Ca in 1% LaCl₃. Quantitative measurements were expressed in milligrams for gram of dried tissue. For some samples the length of the arterial segment available was not sufficient to perform all analyses, such specimens did not represent specific subregion analysis.

2.7. Scanning electron microscopy (SEM)

GMA-embedded plaques (10 carotid and 8 femoral specimens) were polished with graded silicon carbide grinding paper (Struers Denmark) and then gold–palladium-coated on a Desk III (Denton Vacuum, Moorestown, USA). SEM studies were performed with backscattered electrons (Leo 1450 VP, Zeiss, Oberkochen, Germany). Phospho-calcic ratios were determined by energy dispersive system X ray analysis (Inca Oxford instrument, UK).

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 10.0 software. Comparison of the data was assessed by either the Chi Square test

Table 1
Clinical presentation and delay to surgery of the seven symptomatic carotid patients.

Symptoms	Type	Delay to surgery (days)
Hemiparesis	Infarction	147
Aphasia and brachiofacial paresis	Infarction	118
Brachiofacial paresis	Infarction	58
Facial paresis	Infarction	40
Amaurosis fugax	Transient ischemic attack	120
Brachiofacial paresis	Infarction	15
Aphasia and brachiofacial paresis	Infarction	15

or the two-sample Student's *t*-test. For phospho-calcic ratio analysis, non-parametric the Mann and Whitney test was used. $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Baseline characteristics

Eighty-eight patients were enrolled in the study; 45 underwent carotid endarterectomy (mean age 69.7 ± 1.65 years, range 36–84) and 43 underwent femoral endarterectomy (mean age 69.2 ± 1.5 years, range 59–85). In carotid endarterectomy specimens, 7 and 38 patients were respectively symptomatic and asymptomatic. The clinical presentation of symptomatic patients was detailed in Table 1. A comparison of baseline clinical and biological preoperative data is shown in Table 2. There was no significant difference between the two groups in terms of age, gender, cardiovascular risk factors, coronaropathy disease, renal failure, statins, antiplatelet therapies and vitamin K antagonists ($p = \text{NS}$). Lipid and phosphocalcic parameters were similar in both groups of patients, regardless of vitamin D level, which was lower in patients with femoral endarterectomy ($p < 0.05$).

3.1.1. AHA specimen classification

The histological analysis according to AHA modified classification for human femoral and carotid plaques is shown in Fig. 1. Seventy-five percent of carotid plaques were classified as fibrous cap atheroma (types IV and V) versus 7% of the femoral plaques ($p < 0.001$). On the other hand, 93% of femoral plaques were classified as fibrocalcific plaques (types VII and VIII) versus 25% of carotid plaques ($p < 0.001$).

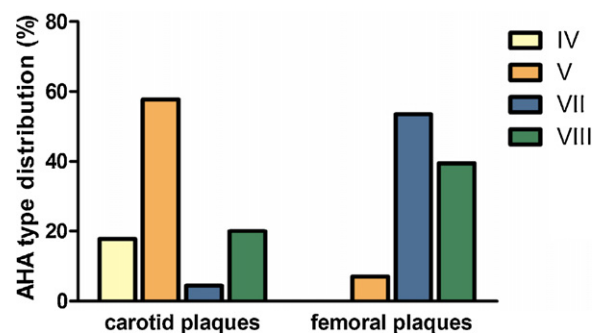


Fig. 1. Histological classification of carotid and femoral plaques according to a slightly modified AHA classification (15). Types IV and V are defined as fibrous cap atheroma. Types VII and VIII are defined as fibrocalcific plaques.

3.1.2. Femoral and carotid plaques display different mineral patterns

Sampling of human atherosclerotic plaques from patients undergoing carotid or femoral endarterectomy indicated the presence of 4 types of calcifications: sheetlike calcification, nodular calcification, clear centre calcification and osteoid metaplasia. Sheetlike calcification was defined as a calcification front within fibrosis, surrounded by numerous calcified micronodules (Fig. 2A and E). Nodular calcification was characterized by numerous stratified deposits of calcification with multinodular edges, consistent with an aggregation phenomenon, and the presence of very few cells (Fig. 2B and F). Clear centre calcification consisted of vesicle-like structure outlined with calcium deposits (Fig. 2C and G). The last type of calcification was osteoid metaplasia that consisted of mature bone with typical lamellar structure and often bone marrow (Fig. 2D and H). The prevalence of each type of calcification was compared (Fig. 3A). Femoral plaques exhibited significantly more sheetlike calcification (86% vs. 62%; $p < 0.05$) and nodular calcification (84% vs. 58%, $p < 0.01$) when compared to carotid plaques. The clear centre calcification prevalence was similar between both specimen types. Femoral plaques more often displayed osteoid metaplasia (63% vs. 20%, $p < 0.001$) when compared to carotid plaques. We noticed that osteoid metaplasia always developed in deep regions of the intimal layer, close to the media and vasa vasorum (data not shown). Histological analysis of sampling of femoral and carotid plaques did not indicate higher density of calcium in the outer part of the media. Twenty-seven carotid specimens and 23 femoral specimens were analyzed to determine the calcium level

Table 2
Baseline characteristics, treatment and biomarkers according to atheromatous plaque location.

	Carotid plaques (n = 45)	Femoral plaques (n = 43)	p
Demographic data and medical history ^a			
Age, y	69.7 (± 1.65)	69.2 (± 1.5)	0.8
Male, % (n)	71.1 (32)	86 (37)	0.12
Hypertension, % (n)	88.9 (40)	81.4 (35)	0.32
Diabetes, % (n)	17.8 (8)	20.9 (9)	0.71
Hypercholesterolaemia, % (n)	82.2 (37)	83.7 (36)	0.85
Smoking, % (n)	71.1 (32)	72.1 (31)	0.92
Body mass index, kg/m ²	26.5 (± 0.7)	26.4 (± 0.6)	0.92
Coronaropathy, % (n)	55.6 (25)	53.5 (23)	0.85
Renal failure, % (n)	48.9 (22)	41.9 (18)	0.51
Medications ^a			
Statins, % (n)	84.4 (38)	76.7 (33)	0.36
Vitamin K antagonists, % (n)	2.2 (1)	4 (9.3)	0.15
Antiplatelet agents, % (n)	100 (45)	93 (40)	0.11
Biomarkers ^a			
LDL-C (g/L)	1 (± 0.05)	0.94 (± 0.05)	0.36
Vitamin D (ng/mL)	17.7 (± 1.58)	12.26 (± 1.06)	0.006
PTH (pg/mL)	51.96 (± 4.26)	54 (± 3.55)	0.71
Ionised calcium (mmol/L)	1.24 (± 0.01)	1.22 (± 0.01)	0.3

^a Clinical characteristics 'medications' and 'biomarkers' are expressed as mean $\pm$ SEM or % (n). LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol.

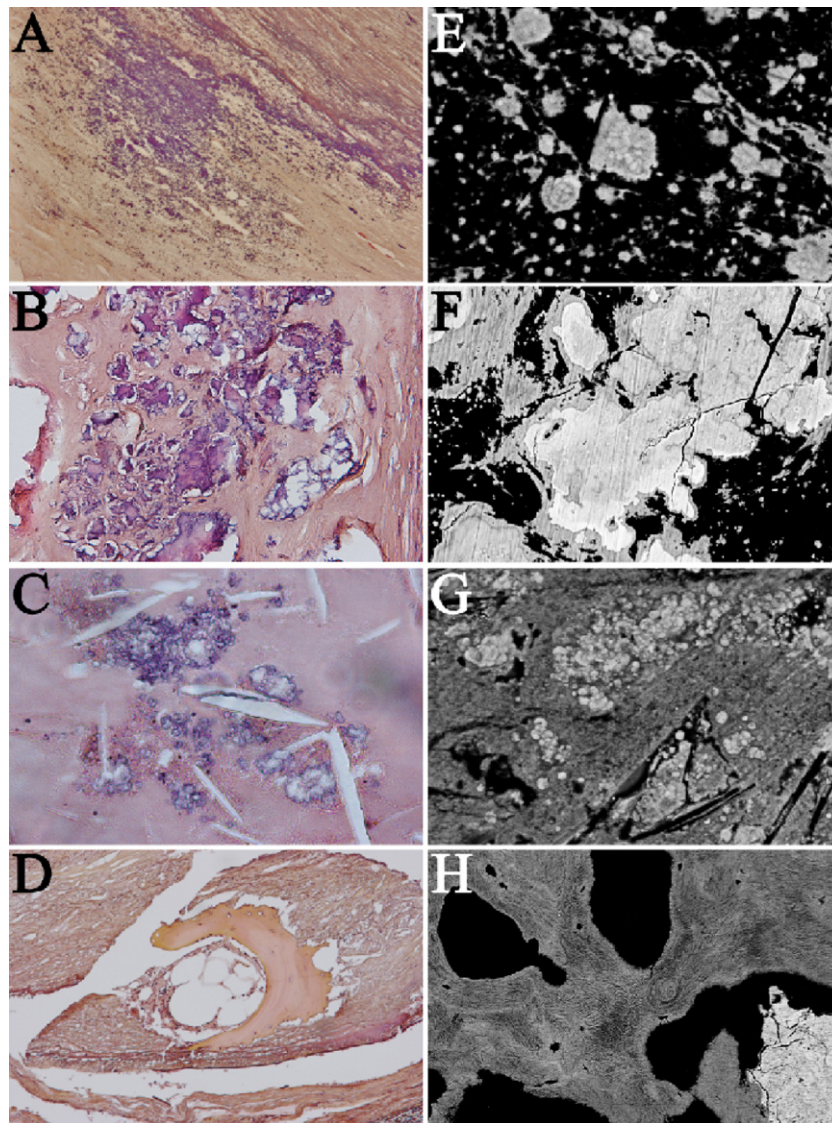


Fig. 2. Hematoxylin eosin and safran (HES) staining and scanning electron microscopy (SEM) backscattered electron images. (A) HES stain, original magnification 200 $\times$, sheetlike calcifications. (B) HES stain, original magnification 200 $\times$, nodular calcifications. (C) HES stain, original magnification 400 $\times$, clear centre calcifications. (D) HES stain, original magnification 100 $\times$, osteoid metaplasia. (E) SEM, original magnification 1000 $\times$, sheetlike calcifications (F) SEM, original magnification 500 $\times$, nodular calcifications (G) SEM, original magnification 1000 $\times$, clear centre calcifications (H) SEM, original magnification 250 $\times$, osteoid metaplasia.

within the plaque. Femoral plaques displayed significantly higher amounts of calcium (194 ± 33 mg/g vs. 85 ± 16.2 mg/g; $p < 0.01$) as compared to carotid plaques (Fig. 3B). The phospho-calcic atomic ratio determined by SEM was similar in carotid (1.89 ± 0.05) and femoral plaques (1.85 ± 0.34), $p = 0.11$. These results are consistent with the presence of hydroxyapatite crystal.

CD31 and smooth muscle-actin immunostaining were not different between atherosclerotic plaques from patients undergoing carotid or femoral endarterectomy.

3.1.3. Carotid plaques display more lipid and inflammation patterns than femoral plaques

We observed intra- and extracellular lipid deposits within the plaque. Non esterified cholesterol was found within the macrophages (Fig. 4A). Results for quantitative analyses are shown in Fig. 4B. Total cholesterol values differed significantly between carotid and femoral plaques. Mean cholesterol levels were higher in carotid plaques compared to femoral plaques (39.85 ± 5.6 mg/g vs. 10.5 ± 1.79 mg/g; $p < 0.001$). Concerning the distribution of inflammatory cells, twenty carotid and femoral specimen were analyzed.

The mean total percentage of macrophage area was $15.2 \pm 3.14\%$ within carotid plaques versus $6.13 \pm 2.2\%$ within femoral plaques ($p < 0.05$) (Fig. 5A). Carotid plaques (Fig. 5C) showed a higher content of CD68 positive cells in relation to the total section area than femoral plaques (Fig. 5D): $310.5 \pm 49.15/\text{mm}^2$ versus $174.5 \pm 39.75/\text{mm}^2$, $p < 0.05$ (Fig. 5B).

4. Discussion

In this study we have observed that, in comparable groups of patients, femoral and carotid plaques showed different morphology. Indeed, carotid arteries displayed more lipid and inflammatory content than femoral arteries while femoral arteries were more prone to calcify and to develop osteoid metaplasia.

Site specificity for atherosclerosis is largely described. Numerous factors could influence regionally distinct atherosclerotic lesion development and therefore morphology of atheromatous plaques. Site-selectivity of atherosclerotic lesions includes differences in hemodynamics, the underlying wall structure, cardio-vascular risk factors and cellular or biochemical parameters of the arterial wall.

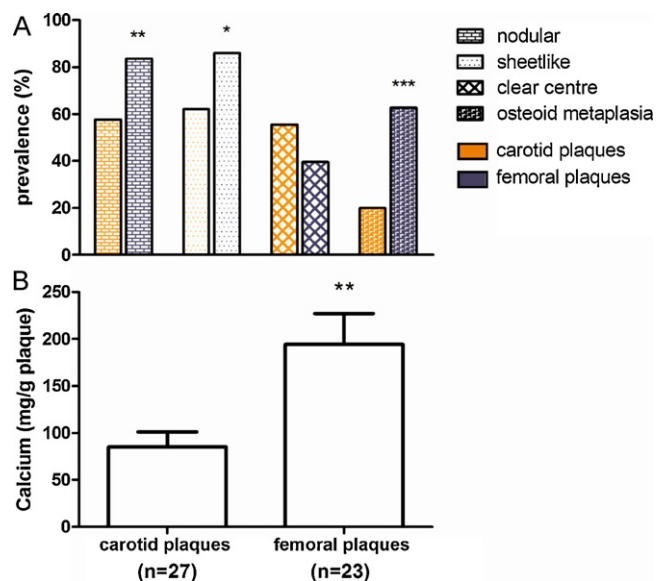


Fig. 3. Qualitative (A) and quantitative (B, expressed as mean $\pm$ SEM) assessments of mineral patterns in carotid and femoral plaques. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Site-specific arterial wall structure could have a potential influence. However, carotid and femoral artery bifurcations are both considered as a transitional zone between elastic and muscular artery types without striking arterial geometry differences [17]. Regarding blood flow patterns, this varies in different regions in quantitative detail and these variations could have a complex effect on the development of atherosclerosis. For example, peak/mean wall shear rates are higher in carotid arteries than in femoral artery [18]. Blood flow variations may influence the relative residence time of lipoproteins, blood borne molecules and inflammatory cells that come in contact with the endothelial cells in each of these regions [19]. On the other hand, the hemodynamic patterns may prime the gene expression profile of endothelial cells in subtle different ways so that these cells

react differently to cardiovascular risk factors [20]. Like coronary artery lesions, PAD is influenced by cardio-vascular risk factors. For instance, Baumgartner et al. have described a different distribution pattern of lower limb atherosclerosis according to the cardiovascular risk factor profile of patients with peripheral arterial occlusive disease [21]. Risk factor profiles for each vascular territory are different insofar as there is some evidence of a stronger association between large vessel disease and smoking and dyslipidemia, whereas diabetes appears more specific for small vessel disease. In their study, patterns of plaques were not described. Different studies have already reported cellular or biochemical variations in the arterial wall. To test the hypothesis of intrinsic differences in the artery wall, Haimovici et al. used aortic homograft transplantation to examine the responses of different aortic segments to a high fat atherogenic diet. Aortic segments in dogs from atherosclerosis-resistant thoracic aorta were transplanted into atherosclerosis-susceptible abdominal aorta and vice versa. After 1 year, the authors observed that atherosclerosis-resistant segments transplanted into atherosclerosis-prone positions in the abdominal aorta remained lesion free even though abdominal aorta flanking the transplanted thoracic segment developed severe aortic atherosclerosis. In the same animals, atherosclerosis-prone segments transplanted into atherosclerosis-resistant positions still developed severe aortic atherosclerosis even though the flanking thoracic aorta was lesion-free [22]. The diversity of the origins of vascular cells could provide explanations about how blood vessels differ from one another and why they respond in disparate ways to common risk factors associated with vascular disease. Indeed, Majesky emphasizes that smooth muscle cell arise from distinct sources of progenitors, each with its own unique lineage and developmental history and consequently participate to the vascular bed-specific patterns of atherosclerosis [23].

In the present study, the calcium content was higher in femoral plaques than in carotid plaques although the phospho-calcic atomic ratio was similar between both types of plaques. There is no evidence for higher prevalence of Monckeberg's disease in femoral versus carotid specimens in our study. Nevertheless, Monckeberg's sclerosis is common in peripheral artery it could be difficult to distinguish Monckeberg's lesions from advanced atherosclerotic

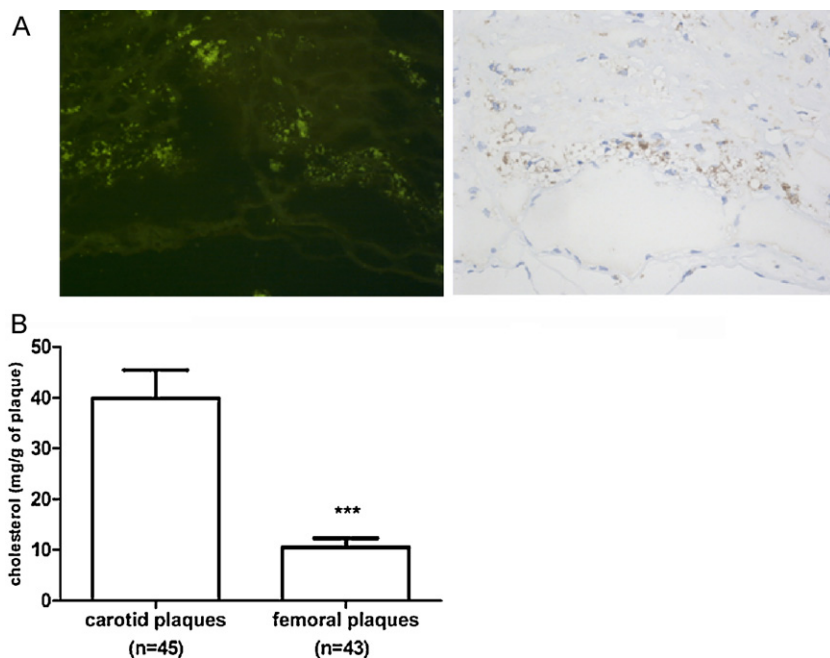


Fig. 4. (A) Lipid staining was obtained with filipin and macrophages were stained by a monoclonal antibody directed against CD68. (B) Quantitative measurements of cholesterol within carotid and femoral plaques were expressed in milligrams per gram $\pm$ SEM of dried tissue. *** $p < 0.01$.

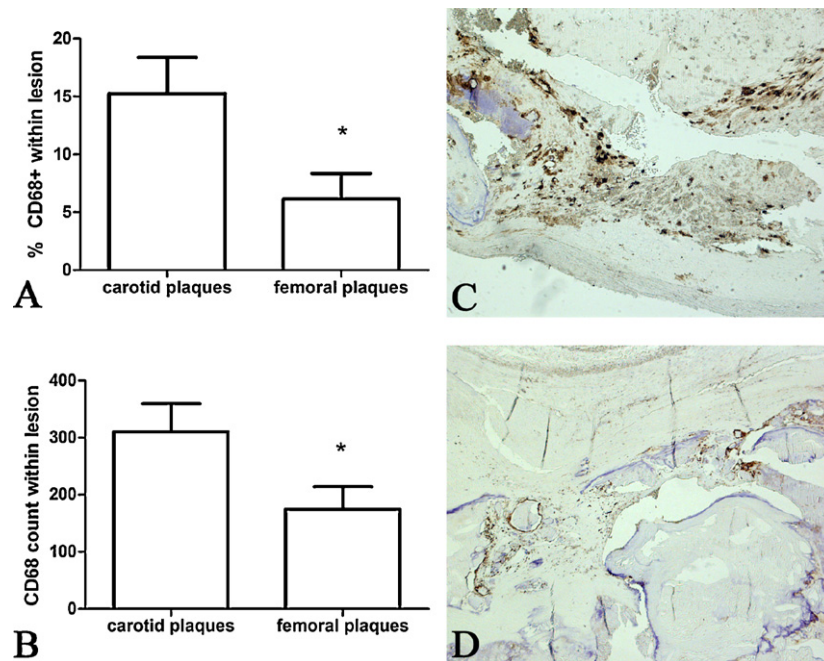


Fig. 5. Quantitative measurements of macrophages within carotid and femoral arteries (A and B) $*p < 0.05$. (C) Example of CD68 staining of a carotid specimen, original magnification 50 $\times$. (D) Example of CD68 staining of a femoral specimen, original magnification 50 $\times$.

lesions [24]. CT scan for arterial calcium is a non-invasive tool for obtaining information about the presence, location and extent of calcified plaques in the arteries [11]. The findings on CT scans are expressed as a calcium score. These studies have shown that calcification varies according to each arterial bed. For example, calcium scoring was higher in iliac arteries than in carotid arteries. Differences in the content of calcium according to the arterial region is consistent with the histological grading that showed that femoral plaques are classified as fibrocalcific (VII and VIII types) whereas carotid plaques are classified as fibrous cap atheroma (IV and V types). In an autopsy study, Dalager et al. analyzed the coronary, carotid and superficial femoral arteries from 100 individuals [15]. They clearly showed the artery related differences in phenotypic expression of atherosclerotic plaques. In the bifurcated carotid region most of the plaques were lipid core plaques (types IV and V) and more than half of femoral plaques were classified as fibrous type VIII lesions. In another autopsic study, Sawabe et al. revealed that the severity of atherosclerosis differed among arteries. They observed that the aorta and arteries of the lower extremities were severely affected, while the abdominal arteries, such as the splenic and superior mesenteric arteries, were mildly affected [25]. Initiation and rate of lesion progression should be taken into account to interpret the histological grading related differences. Indeed our analysis is confined to a single point and assumes a similar rate of atheromatous disease progression in each plaque location. Moreover, Stary showed that the natural trend of the plaque was toward a fibrocalcific phenotype [26]. According to Dalager et al. carotid plaques seem to be observed sooner than femoral plaques with a prevalence of lipid core plaques [15]. Consequently, these findings suggest the hypothesis of different kinetics of progression of atheromatous plaques according to the arterial region, however to date no data are available on this matter.

Femoral plaques exhibit significantly more sheetlike calcification, nodular calcification and osteoid metaplasia than carotid plaques. The most striking difference between both types of plaques is related to the prevalence of osteoid metaplasia in femoral plaques. Up to date, different studies reported the presence of both cartilaginous and bone formation in atheromatous plaques but few

studies reported prevalence of osteoid metaplasia in peripheral arteries [13,27,28]. In carotid arteries, the prevalence of ossification was evaluated approximatively between 9% and 13% [13,28]. These data are consistent with our own results. The origin of this pathological change has been attributed to metaplastic osteogenesis along an endochondral pathway [29]. Although we have punctually found cartilage tissue in our specimens (data not shown), membranous ossification could not be excluded. In membranous ossification bone is built via the differentiation of mesenchymal cells in osteoblasts that product osteoid matrix that is further mineralized.

We observed a significant increase of the serum level of vitamin D in the patients from the carotid group although all levels were clearly under normal values in both groups. It is clear that vitamin D could influence PAD because of its effect on target cells and tissues [30]. However, there is controversy concerning the action of vitamin D on arterial calcification in humans. Even though vitamin D promotes calcifications in vitro [31], in clinical studies authors reported either no effect or an inverse relationship between vitamin D levels and vascular calcification [32–34].

The present study is a cross-sectional study of carotid and femoral plaques obtained from different patients at a single point in time. Consequently, we cannot rule out a bias created by harvesting carotid and femoral plaques in different patients. Indeed, in order to obtain a better matching, carotid and femoral plaques should be harvested in the same patient. Obviously, few patients require both femoral and carotid endarterectomy at a single point in time. Although we can only postulate that the observed lesions represent the late plaque lesion, further studies of plaques are needed with a wide range of disease severity to further define plaque morphology, cellular and molecular factors involved in progression from the apparent early lesion to clinically significant artery stenosis. Furthermore, factors such as the delay between symptoms onset could influence plaque type. These factors differ between groups and could be a limit to this study. In carotid arteries, surgery is requested for different degree of stenosis according the symptomatology [35]. Moreover, in symptomatic carotids, it is recommended to undergo surgery in the 15 days following the onset of symptoms

[35]. For femoral arteries, each patient underwent conservative therapy combined at least for 3 months before surgical procedure but the delay prior to surgery differs a lot between each patient according their clinical history.

The results of this study demonstrate that femoral and carotid plaques show different morphology at a single point in time. Mechanisms and clinical implications of atheroma plaques heterogeneity within the arterial tree should be investigated for a better understanding of the characteristics of the arteries and to choose the best medical, endovascular or surgical option to treat atheromatous lesions.

Acknowledgements

We thank Jean-Baptiste Michel, Béatrice Guyomarch, Alexandra Auvrignon, Karine Fajoles, Brigitte Hauraix and Stéphanie Crossouard for their excellent assistance. We also thank Marja Steenman for reviewing the English text of this manuscript.

References

- [1] Sabouret P, Cacoub P, Dallongeville J, et al. REACH Registry investigators REACH: international prospective observational registry in patients at risk of atherothrombotic events. Results for the French arm at baseline and one year. *Arch Cardiovasc Dis* 2008;101(2):81–8.
- [2] Lal BK, Hobson 2nd RW, Goldstein J, et al. In-stent recurrent stenosis after carotid artery stenting: life table analysis and clinical relevance. *J Vasc Surg* 2003;38(6):1162–8.
- [3] Schillinger M, Sabeti S, Loewe C, et al. Balloon angioplasty versus implantation of nitinol stents in the superficial femoral artery. *N Engl J Med* 2006;354(18):1879–88.
- [4] Babapulle MN, Eisenberg MJ. Coated stents for the prevention of restenosis: part II. *Circulation* 2002;106(22):2859–66.
- [5] Haider SN, Kavanagh EG, Forlee M, et al. Two-year outcome with preferential use of infrainguinal angioplasty for critical ischemia. *J Vasc Surg* 2006;43(3):504–12.
- [6] Morice MC, Serruys P, Sousa JE, et al. RAVEL Study Group. Randomized study with the sirolimus-coated Bx velocity balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo native coronary artery lesions. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002;346(23):1773–80.
- [7] Schillinger M, Minar E. Past, present and future of femoropopliteal stenting. *J Endovasc Ther* 2009;16(Suppl 1):147–52.
- [8] Endo A, Hirayama H, Yoshida O, et al. Arterial remodeling influences the development of intimal hyperplasia after stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(1):70–5.
- [9] Finet G, Weissman NJ, Mintz GS, et al. Mechanism of lumen enlargement with direct stenting versus predilatation stenting: influence of remodelling and plaque characteristics assessed by volumetric intracoronary ultrasound. *Heart* 2003;89(1):84–90.
- [10] Sahara M, Kirigaya H, Oikawa Y, et al. Arterial remodeling patterns before intervention predict diffuse in-stent restenosis: an intravascular ultrasound study. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(10):1731–8.
- [11] Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte Jr M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;15(4):827–32.
- [12] Allison MA, Criqui M, Wright CM. Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:331–6.
- [13] Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, et al. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke* 2002;33(5):1214–9.
- [14] Kruth HS. Localization of unesterified cholesterol in human atherosclerotic lesions demonstration of filipin-positive, oil-red-O-negative particles. *Am J Pathol* 1984;114(2):201–8.
- [15] Dalager S, Paaske WP, Kristensen IB, Laurberg JM, Falk E. Artery-related differences in atherosclerosis expression: implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke* 2007;38(10):2698–705.
- [16] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(12):1262–75.
- [17] Janzen J. The microscopic transitional zone between elastic and muscular arteries. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2004;97(9):909–14.
- [18] Reneman RS, Arts T, Hoeks AP. Wall shear stress—an important determinant of endothelial cell function and structure—in the arterial system in vivo discrepancies with theory. *J Vasc Res* 2006;43(3):251–69.
- [19] VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(1):12–22.
- [20] Hahn C, Swartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(1):53–62.
- [21] Diehm NSA, Silvestro A, Do DD, et al. Association of cardiovascular risk factors with pattern of lower limb atherosclerosis in 2659 patients undergoing angioplasty. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;31(1):59–63.
- [22] Haimovici H, Maier N. Fate of aortic homografts in canine atherosclerosis. 3. Study of fresh abdominal and thoracic aortic implants into thoracic aorta: role of tissue susceptibility in atherogenesis. *Arch Surg* 1964;89:961–9.
- [23] Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(6):1248–58.
- [24] McCullough PA, Agrawal V, Danielewicz E, Abela GS. Accelerated atherosclerotic calcification and Mönckeberg's Sclerosis: a continuum of advanced vascular pathology in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:1585–98.
- [25] Sawabe M, Arai T, Kasahara I, et al. Sustained progression and loss of the gender-related difference in atherosclerosis in the very old: a pathological study of 1074 consecutive autopsy cases. *Atherosclerosis* 2006;186(2):374–9.
- [26] Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1177–8.
- [27] Qiao JH, Mertens RB, Fishbein MC, Geller SA. Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: morphologic evidence of enchondral ossification. *Hum Pathol* 2003;34(4):402–7.
- [28] Jeziorska M, McCollum C, Wooley DE. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *Virchows Arch* 1998;433(6):559–65.
- [29] Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 2008;117:2938–48.
- [30] Norman PE, Powell JT, Vitamin D. shedding light on the development of disease in peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(1):39–46.
- [31] Hsu JJ, Tintut Y, Demer LL, Vitamin D. and osteogenic differentiation in the artery wall. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3(5):1542–7.
- [32] Doherty TM, Tang W, Dasalos S, et al. Ethnic origin and serum levels of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 are independent predictors of coronary calcium mass measured by electron-beam computed tomography. *Circulation* 1997;96(5):1477–81.
- [33] London GM, Guérin AP, Verbeke FH, et al. Mineral metabolism and arterial functions in end-stage renal disease: potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(2):613–20.
- [34] Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, et al. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation* 1997;96(6):1755–60.
- [35] Naylor AR, Rothwell PM, Bell PRF. Overview of the principal results and secondary analyses from the European and North American randomised trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;26(2):115–29.

III. Discussion

Ce travail a donc permis de montrer la différence de morphologie entre deux lits artériels siège de lésions d'athérosclérose. Les plaques fémorales sont très calcifiées avec très souvent métaplasie ostéoïde alors que les plaques carotidiennes sont plus inflammatoires, avec présence de nombreux macrophages et contiennent plus de structures lipidiques. Comment expliquer cette différence morphologique entre les deux plaques athéromateuses ?

- **Influence des facteurs environnementaux**

Les facteurs environnementaux ne semblent pas influencer la néoformation des calcifications. En effets, les facteurs de risque des deux cohortes de patients incluses dans l'étude ECLA sont similaires : âge, sexe, risques cardiovasculaires, coronaropathie, insuffisance rénale et traitements médicamenteux. Seul, le dosage en vitamine D est différent avec un dosage sérique plus important pour les patients avec plaques carotidiennes, bien que les taux sériques des deux groupes soit au dessous des valeurs normales. Ce résultat est étonnant compte tenu de la littérature qui montre la participation de la vitamine D dans le processus de calcification vasculaire alors que les plaques carotidiennes présentent moins de dépôts calcaires.

Des récepteurs à la vitamine D ont été identifiés dans la plupart des tissus humains et notamment au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, des cardiomyocytes et des cellules endothéliales (Towler et *al* 2005). En complément de son rôle dans l'homéostasie du calcium et du phosphate, la vitamine D est essentielle sur le développement et le maintien d'un système vasculaire sain. La $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ influence la migration, la prolifération et l'expression des gènes des cellules vasculaires musculaires lisses. Elle a également un rôle sur l'élastogénèse et l'immunomodulation, tous ces processus étant impliqués dans l'athérosclérose et dans la pathologie anévrysmale. Par ailleurs, la $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ présente un effet sur la contractilité des vaisseaux dans l'hypertension essentielle (Norman et *al* 2005).

- **Influence de la structure histologique des artères**

Les artères carotides et fémorales ont la même structure histologique, de type transitionnel, l'histologie étant à cheval entre une artère de type élastique et une artère de type musculaire. Cette histologie identique ne peut donc pas expliquer une différence de calcification des deux types de plaques. Néanmoins, cette structure de type transitionnel de la paroi artérielle peut expliquer la survenue plus fréquente de lésion d'athérosclérose au même titre que les autres

facteurs de risques intrinsèques (troubles hémodynamiques, risques cardiovasculaires et paramètres biochimiques de la paroi artérielle)(Janzen et *al* 2004).

- **Influence de l'origine embryologique du tissu artériel**

Certains auteurs soulignent que l'origine embryologique différente (différence des progéniteurs cellulaires) des cellules vasculaires musculaires lisses pourrait expliquer l'histoire naturelle différente des plaques athéromateuses en fonction de leur localisation (Majesky et *al* 2007). Récemment, Leroux-Berger et collaborateurs ont montré pour la première fois que l'origine embryonnaire des cellules musculaires lisses avait un impact sur leur capacité à se minéraliser et donc sur le timing de leur apparition au niveau de l'arbre artériel aortique. En effet, chez la souris, dans un modèle de culture d'explants aortiques *ex vivo*, l'arc aortique médian originaire de la crête neurale calcifie plus tôt que l'aorte descendante composée de cellules dérivées du mésoderme. Des résultats similaires ont été obtenus en cultivant des cellules musculaires lisses originaires des deux localisations aortiques (Leroux-Berger et *al* 2011). Ces résultats sont par contre discordants par rapport à nos résultats qui montrent une calcification plus importante des plaques fémorales originaires du mésoderme. Comment expliquer cette discordance ? Il peut exister un biais de recrutement de nos échantillons avec des plaques analysées, parvenues à un stade chirurgical : en effet, les plaques carotidiennes sont opérées plus rapidement (symptomatiques ou non) que les plaques fémorales (symptomatiques). On peut donc penser que leur développement est moins avancé quand elles sont opérées par rapport au site fémoral, et que par conséquent, les calcifications sont moins nombreuses. Un moyen de confirmer cette différence de timing dans l'histoire naturelle de la plaque entre les deux lits artériels serait d'analyser sur le cadavre les deux sites artériels (étude en cours).

- **Influence des acteurs cellulaires et moléculaires intervenant dans la genèse de la plaque athéromateuse**

La genèse de la plaque athéromateuse fait intervenir un processus inflammatoire maintenant bien connu. Les lymphocytes B et T sont retrouvés sur le site de la plaque. Dans notre étude, ces cellules ne semblent pas intervenir de façon différente selon les deux lits artériels. La représentation de cette population est cependant biaisée, puisque les échantillons analysés ne comportent qu'une partie de l'épaisseur de la paroi artérielle, la partie la plus interne. Les éléments inflammatoires et notamment les lymphocytes sont le plus souvent situés dans la partie la plus externe de la plaque athéromateuse.

D'autres cellules inflammatoires interviennent dans la genèse de la plaque athéromateuse comme les macrophages et mastocytes (Bobryshev et *al* 2006, Zhang et *al* 2011). Nous avons constaté la présence d'une population macrophagique plus abondante au sein des plaques carotidiennes. Ces cellules, sont-elles responsables de la différence de calcifications des deux sites artériels ? Des débuts de réponses seront donnés dans la partie II de cette thèse, notamment lorsque sera abordée la relation triade OPG/RANK/RANKL et macrophages.

Partie II : Triade et calcifications artérielles

I. Introduction

Nous avons montré que les plaques athéromateuses carotidiennes et fémorales ne présentaient pas la même morphologie, avec des carotides fibrolipidiques et des fémorales plus calcaires. Cette pathologie répondant à un processus inflammatoire, les cellules inflammatoires et les cytokines intervenant dans la genèse de la plaque peuvent moduler le remodelage de cette dernière et intervenir dans sa calcification. Les mastocytes, macrophages et les lymphocytes T sont les cellules de l'inflammation les plus souvent observées dans les lésions d'athérosclérose animale et humaine. Bien que l'on sache maintenant leur rôle de médiateur inflammatoire qui affecte l'endothélium et promeut l'adhérence et la migration des leucocytes dans la plaque athéromateuse, on ne sait toujours pas, à l'heure actuelle, quelle cellule entraîne la dysfonction endothéliale ni quelle cellule s'insinue la première dans la néointima de la plaque athéromateuse (Zhang et *al* 2011). Ces cellules inflammatoires produisent différentes cytokines et d'autres médiateurs inflammatoires responsables de l'histoire naturelle de la plaque.

Dans cette introduction, nous allons revoir brièvement les différentes cellules immunitaires intervenant dans le processus inflammatoire de la plaque athéromateuse.

1. *Le mastocyte*

Les mastocytes sont des cellules tissulaires arrondies ou allongées, de 15 à 25 μm , au noyau rond central et dont le cytoplasme renferme des granulations métachromatiques en microscopie optique et de structure feuilletée et lamellaire en microscopie électronique (Poirier et *al*)

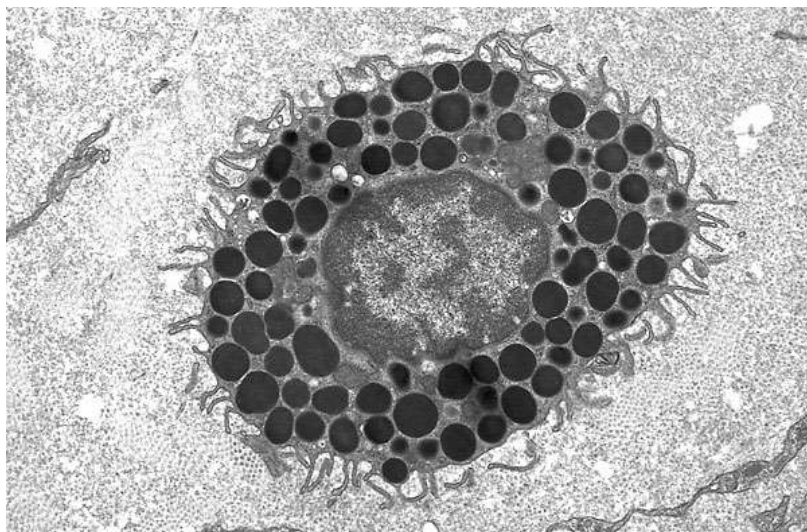


Figure 18 : Mastocyte en microscopie électronique, x 5000 (U957)

Deux types de mastocytes sont identifiés, les mastocytes liés aux muqueuses, présents dans le parenchyme pulmonaire et colique et les mastocytes liés aux tissus conjonctifs comme le tissu périvasculaire. Les mastocytes sont observés dans les tissus souvent en réponse à des infections bactériennes, virales et parasitaires (Bot et *al* 2008). Ces cellules inflammatoires ne sont pas seulement en première ligne de la défense contre les agents infectieux mais représentent également des médiateurs importants de certaines maladies comme les phénomènes allergiques (urticaire, rhume des foins, asthme, choc anaphylactique) (Galli et *al* 2005, Krishnaswamy et *al* 2006). Les mastocytes comportent au sein de leur cytoplasme des granules qui renferment des protéases (chymase, tryptase, cathepsines...), l'histamine, l'héparine et des cytokines comme le TNF α . Les mastocytes peuvent également produire des chémokines (MCP-1, IL-8) et d'autres facteurs comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (Krishnaswamy et *al* 2006). Cette cellule a également un rôle pro-athérogène.

a) Rôle dans la dysfonction endothéliale

Les mastocytes résident dans le tissu périvasculaire des artères saines et durant l'athérosclérose, ils s'accumulent au sein de l'adventice leur nombre augmentant avec la progression de la plaque (Atkinson et *al* 1994). Les constituants des mastocytes comme l'histamine, prostaglandine D2 et les leukotriènes peuvent avoir un rôle dans l'athérosclérose et notamment dans la dysfonction endothéliale et la vasoréactivité (Forman et *al* 1985).

b) Rôle dans l'accumulation de lipides

Les mastocytes inhibent l'oxydation des LDL induite par les macrophages (Lindstedt et *al* 1993) ; ils sécrètent par ailleurs de l'héparine protéoglycane (HPG) contenant des granules qui se lient aux LDL. La liaison HPG-LDL est phagocytée par les macrophages entraînant l'accumulation de lipides au sein de la paroi vasculaire (Paananen et *al* 1994, Kaartinen et *al* 1995). En addition, la chymase est capable de dégrader l'apoE et apoAII, entraînant une réduction de l'efflux de cholestérol des macrophages vers ces apolipoprotéines, entraînant ainsi la formation des cellules spumeuses (Lee et *al* 2002). Les mastocytes ont par ailleurs un pouvoir de recrutement des macrophages au sein de la plaque par le biais de la sécrétion de Monocyte Chemoattractant protein-1 (MCP-1) et d'IL-8 (Kinoshita et *al* 2005).

c) Les mastocytes interviennent également dans la vulnérabilité de la plaque

Les protéases mastocytaires (tryptase et chymase) sont capables d'activer les métalloprotéases matricielles (MMP) responsables de la dégradation de l'élastine et du collagène (Kaartinen et *al* 1994, Lees et *al* 1994, Gruber et *al* 1989, Johnson et *al* 1998). De plus, les mastocytes auraient un rôle dans la genèse de la néovascularisation de la plaque, elle même responsable de sa vulnérabilité. La production mastocytaire de VEGF et de bFGF contribue à la formation de microvaisseaux (Boesiger et *al* 1998, Lappalainen et *al* 2004). La production d'histamine aboutit à l'hémorragie intraplaque (Kaartinen et *al* 1996). Enfin, les mastocytes semblent induire l'apoptose des cellules musculaires lisses (Leskinen et *al* 2006) (processus intervenant dans la calcification vasculaire) et des cellules endothéliales (Heikkilä et *al* 2008).

d) Rôle dans la calcification de la plaque

Des amas de mastocytes sont détectés dans l'intima à des stades avancés de la formation de la plaque, principalement en périphérie près de calcifications débutantes pouvant faire penser à un rôle de ces cellules dans le processus de calcification (Jeziorska et *al* 1998). Récemment, le rôle des mastocytes dans l'ostéoclastogenèse a été démontré par Biosse-Duplan et *al*. Dans un modèle de remodelage osseux mandibulaire *in vivo* chez le rat, le traitement par histamine stimule la formation d'ostéoclastes. *In vitro*, le traitement par RANKL et le MCSF de splénocytes de souris déficientes pour l'histamine diminuerait l'ostéoclastogenèse (Biosse-Duplan et *al* 2009). Les ostéoclastes seraient eux-mêmes source d'histamine.

La figure 19 (page suivante) résume l'implication du mastocyte en pathologie cardiovasculaire aigüe.

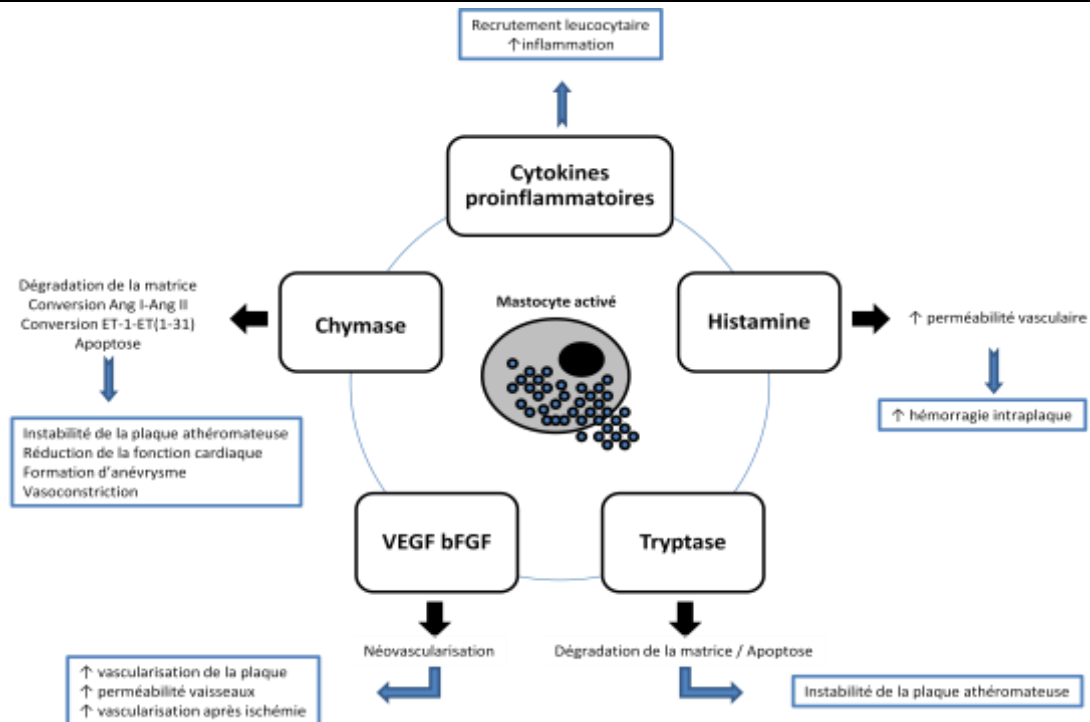


Figure 19 : Médiateurs mastocytaires impliqués en pathologie cardiovasculaire aiguë (d'après Bot I et al 2008). Les mastocytes sont à l'origine de nombreux médiateurs solubles (enzymes, facteurs de croissance) contrôlant le développement de la plaque en influant sur sa vascularisation, le recrutement de cellules inflammatoires et la stabilité de la plaque.

2. Les cellules de la lignée monocyttaire : monocyte, macrophage, cellule dendritique

Les monocytes prennent naissance dans la moëlle hématopoïétique à partir de précurseurs communs des cellules dendritiques et des ostéoclastes (Fogg et al 2006). Le M-CSF et son récepteur le CD115 sont indispensables à la différenciation des précurseurs en monocytes (Dai et al 2002, Wiktor-Jedrzejczak et al 1996). Dans le sang, ces précurseurs se dissocient en monocytes et précurseurs de cellules dendritiques (Onai et al 2007). Les cellules dendritiques sont des cellules immunitaires qui internalisent les antigènes pour les présenter aux lymphocytes entraînant l'activation ou la suppression des lymphocytes T. En quittant le sang périphérique pour les différents tissus de l'organisme, les monocytes deviennent des macrophages et acquièrent des morphologies différentes tout en gardant comme principale fonction la phagocytose. Le macrophage est une cellule de grande taille (30 à 60 μm), au rapport nucléo-cytoplasmique bas, au noyau excentré arrondi non nucléolé et à chromatine condensée. Leur cytoplasme est large, clair, hétérogène et vacuolaire. Les monocytes-macrophages exercent leurs actions grâce à leurs propriétés : mobilité, adhérence,

phagocytose, digestion et sécrétion. Leurs rôles au niveau de la plaque athéromateuse sont multiples.

a) Adhérence leucocytaire

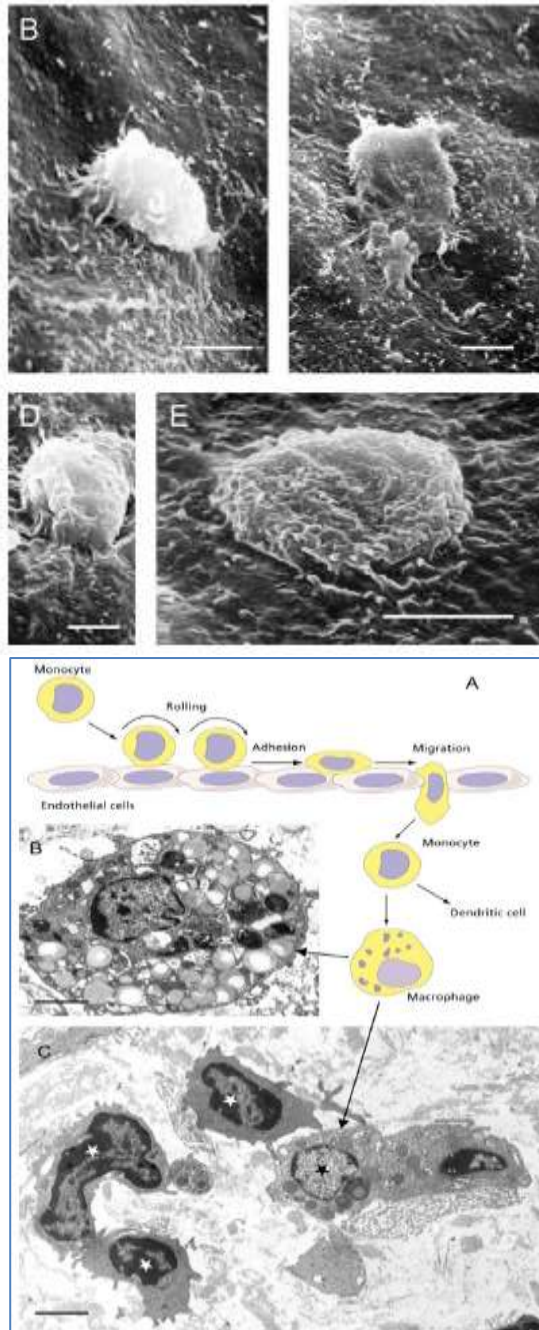
Le Monocyte Chemoattractant protein-1 (MCP-1) et l'IL-8, sécrétés par l'endothélium, jouent un rôle chimiotactique pour l'infiltration des leucocytes dans la paroi artérielle. L'altération de l'endothélium est l'évènement initial de la genèse de la plaque athéromateuse permettant ainsi le dépôt, la rétention et la modification des LDL dans l'intima vasculaire (LDL oxydés). La dysfonction endothéliale induit des molécules d'adhésion pour les cellules inflammatoires comme ICAM-1, VCAM-1, E-selectine et la fibronectine. Cela provoque le recrutement dans l'intima de monocytes circulants et leur transformation en macrophages/cellules spumeuses. Ce processus est appelé l'adhérence leucocytaire comportant plusieurs phases : la capture, le rolling, l'activation et la migration transendothéliale (Bobryshev et *al* 2006) (Figure 20).

b) Les macrophages donnent naissance aux cellules spumeuses

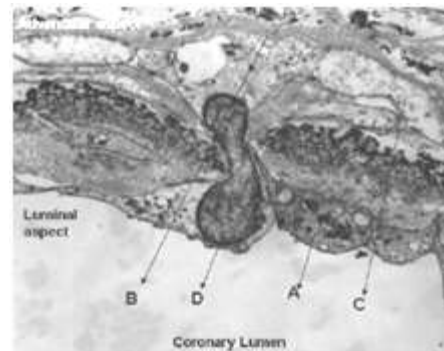
Les macrophages sécrètent le M-CSF qui stimulent la prolifération macrophagique et induit l'expression des récepteurs scavenger de type A, le Scavenger Receptor-A (SR-A) ou de type BCD36, Lectin-like ox-LDL (LOX-1) et (Kunjathoor et *al* 2002, Mukhopadhyay et *al* 2009). Ce récepteur est responsable de l'accumulation de cholestérol et de lipides intra-macrophagiques et à la constitution des cellules spumeuses. Ces cellules spumeuses finiront par disparaître par apoptose déversant dans le tissu interstitiel intimal des lipides thrombogéniques.

c) Les macrophages induisent à la fois l'apoptose et la migration des cellules musculaires lisses

Les cellules spumeuses sécrètent par ailleurs des MMP (MMP-2) et de la sphingomyélinase entraînant la production de céramides qui induit l'apoptose des cellules musculaires lisses (Auge et *al* 2004, Kolmakova et *al* 2004). Enfin, les LDL oxydés induisent la production par le macrophage du MIF (Macrophage Inhibitory Factor) qui stimule la migration des cellules musculaires lisses et contribue à l'hyperplasie intimale (Figure 21).



Phase d'adhésion et de début de pénétration du monocyte au sein de l'endothélium (MEB, paroi aortique)



Phase de migration (MET, x 3000)

- A) Cellule endothéliale
- B) Limitante élastique interne
- C) Cellule spumeuse
- D) Monocyte en diapédèse

Figure 20 : Adhésion leucocytaire (Bobryshev et al 2006, Balakrishnan et al 2007) Après migration au sein de la paroi artérielle, le monocyte se transforme soit en macrophage, soit en cellule dendritique présentatrice d'antigènes. La plupart des macrophages deviennent des cellules spumeuses (B), les autres ne présentent pas de vacuoles lipidiques dans leur cytoplasme (C). Dans ce cas, ils sont souvent proches d'autres cellules immunitaires (lymphocytes marqués par une étoile blanche)

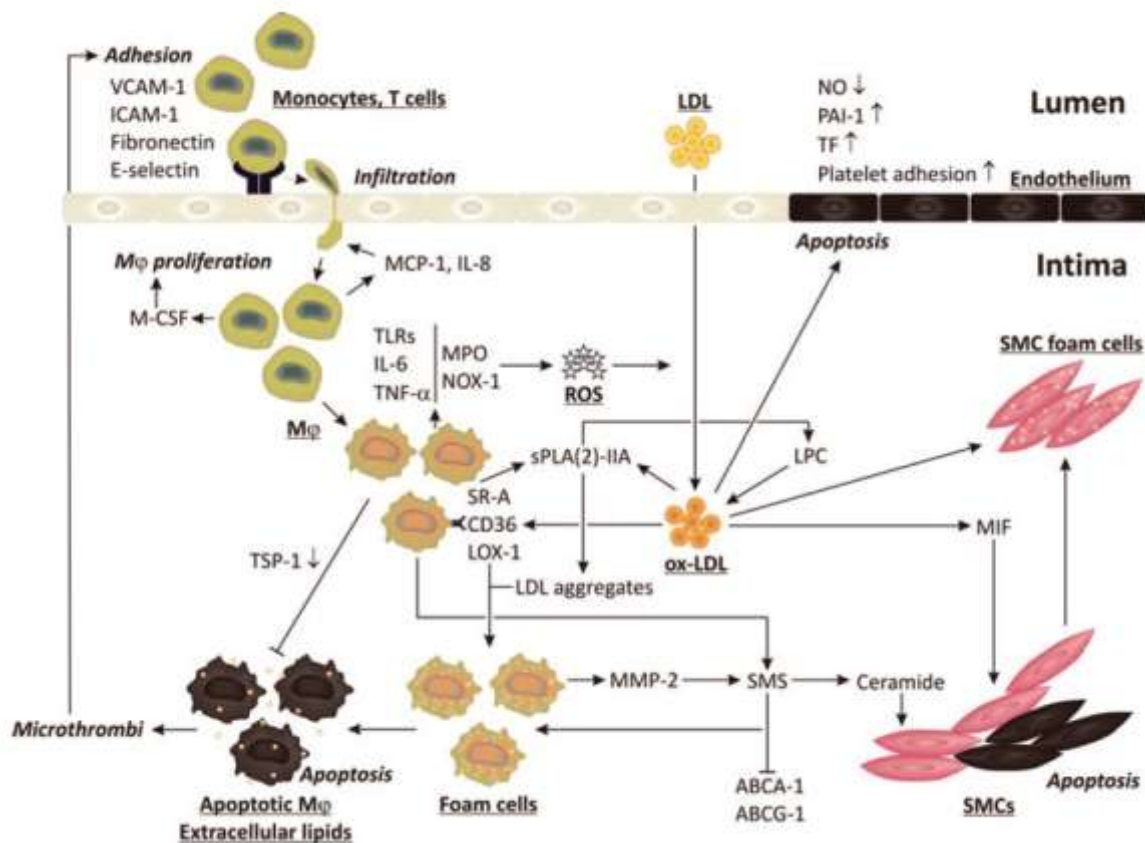


Figure 21: Mécanismes moléculaires de l'inflammation dans la plaque athéromateuse (Hulsmans et al 2010). La dysfonction endothéliale est associée à l'induction de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-selectine et fibronectine) par les cellules inflammatoires. L'infiltration et l'activation des cellules inflammatoires est corrélée avec l'activation des enzymes oxydantes (MPO et NOX-1 entraînant l'oxydation des phospholipides et des protéines en LDL oxydés. L'endothélium sécrète alors du MCP-1 et de l'IL-8 qui entraînent la transmigration des leucocytes. Les macrophages sécrètent du M-CSF stimulant leur prolifération et l'induction de l'expression des récepteurs scavenger CD36, LOX-1 et SR-A. Cela permet la formation de cellules spumeuses qui disparaissent par apoptose et exposent dans la matrice des lipides thrombogènes. Les cellules spumeuses sécrètent des MMP et de la sphingomyélinase entraînant la production de céramide qui induit l'apoptose des cellules musculaires lisses. Les LDL oxydés induisent l'apoptose des cellules endothéliales contribuant à l'érosion de la plaque et à sa rupture.

In vitro, les monocytes humains peuvent se différencier en 5 sous-types : de M0 à M4 en fonction des facteurs de croissance utilisés ; dans les plaques athéromateuses, on observe des macrophages de type M1, M2, M4 (Mantovani et al 2009, Gleissner et al 2010, Kadl et al 2010, Ley et al 2011), chacun de ces sous types ayant des fonctions différentes. Une des fonctions du macrophage dans la plaque athéromateuse est la clearance des cellules apoptotiques : c'est le processus d'efférocytose (Tabas et al 2010). Cette fonction est assurée par les macrophages M2 (Martinez et al 2009). Beaucoup de macrophages spumeux entrent en apoptose. Dans les stades précoces de l'athérosclérose, l'efférocytose macrophagique est

associée à une progression réduite des lésions (Liu et *al* 2005, Tabas et *al* 2005), ceci en réduisant des médiateurs proinflammatoires dans la paroi artérielle (Bhatia et *al* 2007). Dans les lésions d'athérosclérose avancée, cette efferocytose est défaillante et ceci aboutit à une nécrose secondaire des macrophages, relarguant dans l'intima des débris cellulaires, des lipides oxydés et des médiateurs proinflammatoires : ceci correspond à la bouillie athéromateuse (Tabas et *al* 2010). Les monocytes-macrophages sont capables de sécréter différentes cytokines ou autres molécules intervenant dans le processus inflammatoire de la plaque (cf figure 21). Nous avons vu, dans l'introduction de cette thèse, la relation entre les macrophages et la triade OPG/RANK/RANKL. Les monocytes humains en culture primaire expriment fortement l'OPG (Hofbauer et *al* 2000). L'OPG agit sur le système immunitaire en diminuant la survie des cellules dendritiques (Reid et *al* 2009). L'OPG est capable d'induire un chimiotactisme des monocytes en se fixant au syndecan-1 (Mosheimer et *al* 2005). Le rôle de RANKL dans le système immunitaire peut être étendu aux cellules dendritiques (il est capable de stimuler leur activation et leur survie) et aux monocytes (il agirait comme un facteur chimiotactique via son récepteur RANK) (Mosheimer et *al* 2005, Lum et *al* 1999). RANK est exprimé par les lymphocytes, les cellules endothéliales ainsi que par les cellules dendritiques.

3. Les lymphocytes

L'activation macrophagique est rapidement suivie par une réponse immune adaptative consistant à la présentation d'antigènes présentés aux lymphocytes T effecteurs par des cellules présentatrices d'antigènes, les cellules dendritiques. En réponse à différentes cytokines, les lymphocytes T CD4⁺ se différencient en T helper (Th) 1 ou Th2. En sécrétant différentes cytokines, les Th1 et Th2 entraînent la réponse immune humorale aboutissant à la production de différents sous-types d'immunoglobulines. Alors que les Th1 montrent un effet proathérogène, le rôle potentiel des autres sous types de lymphocytes T reste controversé. Les lymphocytes T régulateurs (et notamment la lignée Th17) et quelques cytokines liées aux Th2 joueraient un rôle protecteur (Taleb et *al* 2010).

a) La réponse Th1

La majeure partie des lymphocytes T de la plaque athéromateuse sont de type Th1, proathérogènes et produisant des taux importants d'Interféron - γ (INF- γ). L'INF- γ est responsable de l'activation des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques,

entraînant un cercle vicieux de la réponse inflammatoire de la plaque athéromateuse. L'INF- γ peut inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses et réduire leur production de collagène. D'autre part, cette cytokine augmente l'expression des MMP aboutissant à l'amincissement de la coiffe fibreuse de la plaque (Tedgui et al 2006).

b) La réponse Th2

Les Th2 secrètent de L'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 et aident les lymphocytes B à produire des anticorps. Les Th2 sont plus rarement observés dans la plaque athéromateuse. Leur induction est stimulée par un contexte d'hyperlipidémie. L'IL-4 conduit à la différenciation Th2 via STAT6 qui active le facteur de transcription Gata3, entraînant l'augmentation de l'IL-4 et l'IL-5 et la diminution de l'INF- γ . Ainsi, la réponse Th2 se présente comme une réponse antagoniste de Th1 aux vertus athéroprotectrices (Mallat et al 2009). Cependant, le rôle des Th2 dans le développement de la plaque athéromateuse reste controversé dépendant du stade et/ou du site de la lésion et du modèle animal utilisé, tantôt proathérogène, tantôt antiathérogène (Huber et al 2001, King et al 2007). Cependant les cytokines IL-5 et IL-33 sécrétées par les Th2 semblent être antiathérogènes en stimulant la production d'anticorps anti-LDL oxydés, de type IgM (Miller et al 2008).

c) La réponse T régulatrice

Les cellules Treg sont divisées en 2 types, les Treg naturels et induits. Les Treg naturels sont caractérisés par l'expression de CD4, CD25 et du facteur de transcription FOXP3. Ils se développent dans le thymus et reconnaissent les antigènes du soi. Ils se trouvent ensuite dans les tissus périphériques pour maintenir la tolérance du soi. Les Treg induits naissent dans les tissus périphériques durant une réponse immunitaire. Les Treg naturels et les Treg induits sont chacun importants pour protéger contre l'athérosclérose en agissant sur les cellules T et sur les cellules présentatrices d'antigène (Figure 22) (Taleb et al 2010).

d) La réponse immune humorale

Les lymphocytes B pourraient avoir un rôle protecteur dans l'athérosclérose. Ceci est supporté par des études chez la souris. Quand de la moëlle hématopoïétique de souris déficiente en lymphocyte B est transférée chez une souris irradiée *Ldlr*^{-/-}, ces souris développent des lésions d'athérosclérose au contraire des souris contrôles (Major et al 2002). En contre partie, lorsque des lymphocytes B isolés à partir de souris athéromateuses sont transférés chez des souris *Apoe*^{-/-} splénectomisées, les lésions d'athérosclérose diminuent, ce

qui n'est pas le cas après transfert de lymphocytes CD3⁺ (Caligiuri et *al* 2002). Dans un modèle murin d'athérosclérose *Apoe*^{-/-}, déplété en lymphocytes B par anticorps anti-CD20, l'apport de lymphocytes B d'origine péritonéale (B1) diminuerait les lésions d'athérosclérose alors que l'apport de lymphocytes B d'origine splénique (B2) accélérerait le processus (Ait-Oufella et *al* 2010, Kyaw et *al* 2010). L'expression d'OPG par les lymphocytes B et les cellules dendritiques peut être induite par le TNF α , RANKL, l'IL-1 β et l'activation de CD40 (Schoppet et *al* 2007, Yun et *al* 1998). RANKL est également exprimé en grande quantité par les lymphocytes T (Anderson et *al* 1997, Srivastava et *al* 2003).

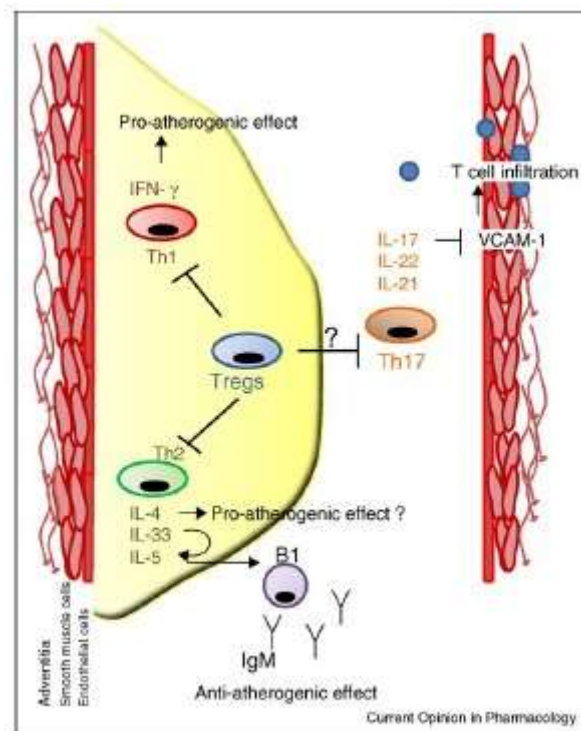


Figure 22 : Rôle et interactions entre les sous-types de lymphocytes T au cours de l'athérosclérose (Taleb et *al* 2010). Les Th1 sont les principaux médiateurs pro-athérogènes. Cette réponse pro-athérogène est contrôlée par les lymphocytes T régulateurs et par les cytokines produites par les Th2 (IL5 et IL33). Les Th17 ont également un rôle protecteur contre l'inflammation vasculaire et la progression de l'athérosclérose.

II. Article 2

Heymann MF*, Herisson F*, Davaine JM, Charrier C, Battaglia S, Passuti N, Lambert G, Yann Gouëffic Y, Heymann D.

Rôle de la triade OPG/RANK/RANKL dans les calcifications de la plaque athéromateuse : comparaison entre les lits artériels carotidiens et fémoraux.

* Contribution identique (article soumis)

Notre travail a permis de montrer une morphologie différentes des plaques athéromateuses carotidiennes et fémorales, les plaques carotidiennes étant plus fibrolipidiques et les plaques fémorales plus fibrocalcaires (Herisson et *al* 2011). Nous avons décrit précédemment l'implication de la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL dans les systèmes ostéoarticulaire, immune et vasculaire. Le but de notre étude était de déterminer l'expression et le rôle potentiel de cette triade au sein de la plaque athéromateuse en comparant plaque carotidienne et fémorale. Deux groupes de 20 patients ont été sélectionnés parmi la cohorte du travail princeps de Herisson et collaborateurs intéressant respectivement des pièces d'endartériectomies carotidiennes et fémorales. L'expression de l'OPG/RANK/RANKL a été analysée par immunohistochimie. En parallèle, les taux sériques d'OPG et RANKL ont été quantifiés par technique ELISA. Sur le plan immunohistochimique, l'OPG était plus souvent observée dans les plaques carotidiennes par rapport aux fémorales (70 versus 50 %) et ceci souvent dans la bouillie athéromateuse. Cette expression était corrélée avec un infiltrat macrophagique plus abondant dans les carotides. De façon surprenante, les taux sériques d'OPG étaient plus faibles pour la population carotidienne comparée aux fémorales (4,03 ng/ml versus 5,53 ng/ml). L'expression de RANK et RANKL était équivalente dans les deux lits artériels (100% versus 95 %). Le taux sérique de RANKL était également identique.

En conclusion, les plaques carotidiennes expriment plus fréquemment l'OPG par rapport aux fémorales qui sont plus calcifiées, cette expression étant corrélée avec un abondant infiltrat macrophagique. L'OPG semble donc jouer un rôle dans la différence de calcification des plaques carotidiennes et fémorales.

**Role of the OPG/RANK/RANKL triad in calcifications of the atheromatous plaques:
comparison between carotid and femoral beds**

Marie-Françoise Heymann^{a,b,c,*}, Fanny Herisson^{a,b,c,*}, Jean-Michel Davaine^{a,b,c}, Céline Charrier^{a,b}, Séverine Battaglia^{a,b}, Norbert Passuti^{a,b,c}, Gilles Lambert^{a,b}, Yann Gouëffic^{c,d}, Dominique Heymann^{a,b,c}

^a INSERM, UMR 957, Nantes F-44035, France

^b Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Nantes F-44035, France

^c CHU de Nantes, Nantes F-44035, France

^d Institut du Thorax, INSERM UMR 915, Nantes F-44035, France

* HMF and HF contributed equally to this work

Corresponding author :

Pr Dominique Heymann

INSERM UMR-S 957

Physiopathologie de la Résorption Osseuse
et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives

Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil

44035 Nantes cedex, France

Phone : 33 (0) 272 641 132 ; Fax : 33 (0) 240 412 860

E-mail : dominique.heyman@univ-nantes.fr

Funding sources:

This study was supported by grant from La Fondation de l'Avenir (ET7-477)

Abstract

Objective: Recent works demonstrated the difference of calcification genesis between carotid and femoral plaques, femoral plaques being more calcified. It has been clearly demonstrated that the molecular triad OPG/RANK/RANKL exerts its activities in the osteoarticular, immune and vascular system. The aim of this study was to determine the expression and the potential role of this molecular triad in calcifications of the atheromatous plaques located in two different peripheral arterial beds, carotid and femoral.

Methods and Results: Two groups of 20 patients having undergone carotid or femoral endarterectomy were enrolled. The expression of OPG, RANK and RANKL was analyzed by immunochemistry in all specimens embedded in paraffin. In parallel, the levels of circulating OPG and RANKL were quantified in blood using specific ELISA assays. OPG staining was more frequently observed in carotid than in femoral plaques (70% versus 50%), especially in the lipid core. Its expression correlated with macrophage infiltration more abundantly observed in carotid specimens. Surprisingly, serum OPG concentration was significantly lower in carotid population compared to femoral population (4.03 ng/ml vs 5.53 ng/ml) while RANK and RANKL were equally expressed in both arterial beds (100% vs 95%). RANKL levels measured in serum were similar between the two groups.

Conclusions: Carotid plaques that are less rich in calcium than femoral specimens, express more frequently OPG, this expression being correlated with the abundance of macrophages in the lesions. These data strengthen the key role played by OPG in the differential calcification in carotid and femoral plaques.

Keys words : carotid, femoral, atherosclerosis, vascular calcification, OPG, RANK, RANKL

Introduction

Vascular calcium deposition can be usefully classified into four histo-anatomical variants, each type being associated with a characteristic spectrum of vascular disease processes: atherosclerotic/fibrotic calcification, cardiac valve calcification, medial artery calcification and vascular calciphylaxis. These four variants arise in response to metabolic, mechanical, infectious and inflammatory injuries [1]. Vascular calcifications, especially of the arteries, often occur with advancing age, atherosclerosis, metabolic disorders (eg, end-stage renal disease, diabetes mellitus) or with rare genetic diseases [2]. In the past 15 years, the prevailing perspective on vascular calcification has evolved.

Human and animal studies have established that atherosclerosis is driven by a chronic inflammatory process within the arterial wall initiated mainly in response to endogenously modified structures, particularly oxidized lipoproteins that stimulate both innate and adaptive immune responses [3]. The innate response is instigated by the activation of both vascular cells (endothelial cells and smooth muscle cells) and monocytes/macrophages. Subsequently, an adaptive immune response develops against an array of potential antigens presented to T lymphocytes by antigens-presenting cells. Endothelial and smooth muscle cells mediate leukocyte recruitment and vascular remodelling such as fibrosis and calcifications [4] through the production of numerous soluble cytokines by inflammatory and vascular cells [5].

Despite many studies, regulatory factors and molecular pathways of vascular calcifications seem still incompletely understood. These pathobiological mechanisms broadly fall into 2 categories: induction of osteogenesis and loss of inhibitors of mineralization [6]. One emerging pathway in vascular biology involves the osteoprotegerin (OPG) / Receptor Activator of NF- κ B (RANK) /

RANK Ligand (RANKL) system, cytokines and receptor related to the TNF-TNF receptor families. RANK, RANKL and OPG play essential roles in the regulation of bone metabolism. RANKL binds to RANK which is expressed by osteoclasts whereas OPG acts as its decoy receptor blocking the RANK-RANKL interaction [7]. OPG is a soluble glycoprotein widely expressed in most human tissues including bone (osteoblasts, mesenchymal stem cells), immune cells (T and B cells) and vessels (endothelial and vascular smooth muscle cells) [2, 8]. RANKL is expressed on osteoblastic, stromal and T cells while RANK is located on the surface of myeloid cell lineages (osteoclasts, monocytic and dendritic cells) [9]. Their expression explain in part their functional involvement in the osteoarticular, immune and vascular systems and their specific implication in the crossroads of immunity and bone metabolism named “osteoimmunology” [7]. Thus, OPG/RANKL couple controls simultaneously the angiogenesis and bone remodeling mechanisms as revealed by OPG deficient mice. Indeed, mice lacking OPG exhibit severe osteoporosis and arterial calcification providing that OPG might be a key molecule linking these vascular and skeletal phenotypes [7, 10]. More recently, Benslimane et al demonstrated that OPG activates endothelial colony-forming cells and consequently induces the formation of microvessels *in vivo* [11].

We have recently shown that femoral and carotid plaques exhibit different morphology in comparable groups of patients [12]. Indeed, fibrouscap atheroma was more frequently observed in carotid arteries (75%) while femoral arteries were more calcified (93%). Supported by the literature, we hypothesized that the molecular triad OPG/RANK/RANKL could play a role in the differential histological patterns of these plaques and in the mechanisms of

calcification. The aim of the present study was to compare the expression of OPG/RANK/RANKL in a cohort of carotid and femoral endarterectomy specimens.

Materials and Methods

Patients

These plaques were harvested from patients undergoing carotid or femoral endarterectomy at the department of vascular surgery of Nantes University Hospital. There was no significant difference between the two groups in terms of ages, gender, cardiovascular risk factors, coronaropathy disease, renal failure, statins, anti-platelet therapies and vitamin K antagonists [12]. The present study included 40 patients (8 females aged 66-89 years, 32 males aged 53-87 years); 50% of them underwent carotid endarterectomy and 50% femoral endarterectomy. All surgical specimens were fixed in 10% formalin overnight, decalcified and embedded in paraffin. Prior to surgery, serum specimens were collected and stored at -80°C until biological assays. Sample collection and handling was performed in accordance with the guidelines of the Medical and Ethical Committee in Nantes, France, and a written informed consent for each patient was requested.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was carried out on adjacent deparaffinized sections (4 µm thick) taken from the central sections of the plaque (4 sections for each monoclonal antibody). Briefly, tissue sections were first treated with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) for 5 min to block endogenous peroxidase and with bovine serum albumin 4% to block the non specific bindings. Primary antibodies against RANK, RANKL, OPG and CD68 (Supplementary data 1) were then incubated over night at 4°C in a humidified atmosphere. Biotinylated polyclonal anti-mouse/goat secondary antibody and

peroxidase-conjugated streptavidin (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were applied for 1 hour each with the use of the extravidine peroxidase for 30 min and then revealed with an AEC staining kit (Sigma Aldrich). Preparations were counterstained with hematoxylin eosin. Negative control was analyzed using a similar procedure excluding the primary antibody. Each case was scored by two independent operators using semi-quantitative method, evaluating the heterogeneous positive distribution and the differing intensity of the staining simultaneously. Immunohistochemistry signals were scored according 4 categories: (-) absence of signal, (+) signal, (++) moderate signal and (+++) strong signal.

OPG, RANKL ELISA

OPG, RANKL concentrations were analyzed in serum aliquots stored at -80°C. The concentration of total OPG was analysed using an ELISA kit (R&D Systems, Abingdon UK). The concentration of RANKL was measured using an ELISA kit (Biomedica, Vienna, Austria). The OPG and RANKL assays were performed according to the manufacturer's instructions. All measures were performed in duplicate and the mean values were used in this study.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a SPSS 10.0 programme. Comparison of the data was assessed by either Chi Square test or two-sample Student's t-test. For OPG, RANKL analyses, non-parametric Mann and Whitney test was used. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Carotid and femoral plaques exhibit differential histological morphologies

As expected [12], carotid and femoral atherosclerotic plaques showed different morphology. Indeed, femoral plaques exhibited significantly more sheet-like calcification (86% vs 62%, $p < 0.05$) and

nodular calcification (84% vs 58 %, $p < 0.01$) (Fig. 1A, B); a lot of them presented osteoid metaplasia (63% vs 20%, $p < 0.001$) (Fig. 1 C); carotid plaques contained more lipidic deposits (Fig. 1 D).

OPG staining is more frequently observed in carotid plaques (being less calcified) than in femoral plaques

The expression of OPG, RANK, RANKL and CD68 has been analyzed by immunohistochemistry in 20 carotid atherosclerotic plaques and 20 femoral specimens. (Table 1). In 14 cases of the 20 carotid specimens (70% of cases) (Fig. 2 A, C), we observed immunostaining for OPG, while only 10 cases of femoral plaques expressed OPG (50 % of cases) (Fig. 2B, D). In carotid specimens, OPG was mainly expressed within the lipid core (64.3%) (Fig. 2A), calcifications (35.7%) and by endothelial cells, macrophages and smooth muscle cells (14.3%) (Fig 2C). In femoral plaques, OPG was more frequently detected associated with calcifications and endothelial cells (90%) (Table 1, Fig 2 B, D). Interestingly, OPG immunopositivity is related to CD68⁺ macrophages population (Table 1). Indeed, OPG was more frequently observed in carotid plaques compared with femoral specimens, this expression being correlated with the presence of more numerous macrophages (Fig. 2E).

RANK and RANKL are similarly expressed in carotid and femoral plaques

One hundred percent of carotid specimens and 95% of femoral plaques expressed RANK and RANKL respectively and to similar extent (Fig. 3). However, although the immunostaining intensity appeared similar, their cell localization was different. Indeed, in carotid plaques, RANK immunoreactivity was mainly located in lipid core and in macrophages (Fig. 3 A) while its localization is observed in calcifications and specifically around of them, and in endothelial cells in femoral

plaques (Fig. 3 B). RANKL immunostaining was observed preferentially in macrophages, calcifications and in endothelial cells of carotid plaques (Fig. 3C). In femoral specimens, RANKL was located in calcifications and endothelial cells. (Fig. 3D).

Serum OPG is significantly lower in the carotid population compared with the femoral group

Serum concentrations of OPG and RANKL were determined in all patients enrolled (Fig. 4). Although serum concentration of RANKL was higher for carotid population (0.66 ± 0.39 pmol/L versus 0.19 ± 0.06 pmol/L), these data were not significant. In contrast to RANKL, serum concentration of OPG was significantly lower in the carotid population compared to the femoral group. The concentration of OPG of carotid population was 4.03 ± 0.8 ng/mL (mean $\pm$ SD) while this concentration was 5.53 ± 0.64 ng/mL in femoral group ($p < 0.02$) (Fig. 4).

Discussion

Mounting evidence suggests that the OPG/RANK/RANKL triad may participate in multiple aspects of the processes governing vascular calcification. The implication of this triad in vascular physiopathology is supported by the expression of these molecules by the normal tissues of cardiovascular system (heart, arteries and veins). Both endothelial cells and vascular smooth muscle cells constitutively express OPG, and such levels are particularly high in aortic and renal arteries [2]. Furthermore, OPG is physically associated with the von Willebrand factor localized in the Weibel-Palade bodies of endothelial cells, can bind to the complex VIII [13] and is rapidly secreted in response to inflammatory stimuli [14]. In contrast, RANKL and RANK are frequently undetectable in normal vessels and non calcified arteries or valves [8]. OPG/RANK/RANKL exerts its

activities simultaneously on endothelial cells and smooth muscle cells. OPG promotes endothelial cell survival through neutralizing pro-apoptotic TRAIL [15]. The triad is also involved in angiogenesis supporting its involvement in revascularization of numerous tissues. Thus, OPG induces endothelial colony-forming cell activation and is a positive regulator of microvessel formation *in vivo* [11]. Similarly, Cross et al also reported a pro-angiogenic effect of OPG which was expressed by tumor endothelial cells [16]. RANKL has also been implicated in endothelial cell metabolism, and induces angiogenesis *in vitro* and *in vivo* by acting as a chemotactic factor for endothelial cells and by inducing their migration [7]. This molecule promotes endothelial proliferation and survival [17], suggesting a potential involvement in the tumor development and increased vascular permeability [18].

OPG is preferentially observed in carotid plaques, arteries that contained more macrophages. Thus this recruitment of macrophages in carotid plaque could be mediated by osteoprotegerin. Indeed, Mosheimer et al demonstrated that osteoprotegerin affects monocyte migration and protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation via syndecan-1. Osteoprotegerin-induced activation of monocyte chemotaxis toward different chemokines is due to the interactions of osteoprotegerin with heparin and chondroitin sulphates [19]. Similarly, RANKL enhances monocyte migration through its binding to its receptor RANK which activates PI3-kinase, phosphodiesterase, and Src kinases [20].

We have demonstrated in a previous study [12], that femoral endarteriectomies were more calcified than carotid specimens, with osteoid metaplasia although the phosphocalcic ratio was similar between both types of plaques. OPG immunostainings (Fig.2) are

consistent with these results. Indeed, OPG positivity was more frequently observed in carotid plaques compared to femoral plaques (70% versus 50%). OPG expression might reflect a protective mechanism against vascular calcifications. The senescence of vascular smooth muscle cells promotes the development of vascular calcification which is responsible of the progression of atherosclerosis [21]. OPG directly inhibits calcification of vascular smooth muscle cells, potentially by a mechanism whereby OPG is secreted via vesicle release from viable or apoptotic vascular smooth muscle cells and potentially limiting the matrix vesicle-driven mineral nucleation and deposition of hydroxyapatite in the vascular wall [22]. In pathology, vascular calcification and osteoporosis frequently occur together and share many of the same risk factors (eg, aging, inflammatory disease, glucocorticoid use, chronic renal failure, or estrogen deficiency). Osteoporotic patients have a higher incidence of arterial calcification and conversely, epidemiological studies indicate that the incidence of osteoporosis is elevated in people with atherosclerosis, cardiovascular disease, or aortic calcifications [23]. Addition to early onset osteoporosis, two-thirds of OPG knockout mice unexpectedly have late medial calcification of renal and aortic arteries [10]. Clearly, the vascular role of OPG is multifaceted and depends of the interplay with its multiples ligands, RANKL and TRAIL, and a bidirectional modulation involving osteogenic, inflammatory and apoptotic responses.

Significant differences of serum concentrations of OPG are noted between carotid and femoral patients. Serum concentration of OPG was significantly lower in carotid population compared to the femoral population (4.03 ng/mL vs 5.53 ng/mL, $P < 0.02$). These results support the difference of calcification of the 2 arterial beds. The data concerning the serum concentrations of OPG are surprisingly opposite to immunohistochemical results. We could

expect to observe serum concentrations of OPG higher for carotid than for femoral patients. This difference between local and systemic environment could be explained by several compensatory mechanisms involving bone and inflammatory regulation. Pro-inflammatory mediators such as TNF- α are able to induce OPG expression in vascular smooth muscle cells and endothelial cells (and particularly in atheromatous plaques) [2, 23] but are also implicated in the development of vascular calcification by inducing ALP [24,25]. Moreover, the calcification processing stimulates the secretion of pro-inflammatory cytokines capable of simultaneously increasing OPG production and enhancing osteogenic differentiation [26, 27]. On the other hand, elevated serum concentrations of OPG are found in a range of cardiovascular pathologies, suggesting the potential value of OPG as a biomarker of vascular risk and prognosis. Cellular studies have suggested a number of mechanisms by which such elevated concentrations of OPG could promote the progression and instability of atherosclerosis. [26].

Is the prognosis for femoral patients worse than for carotid patients? It is difficult to answer given the short duration of patient follow-up. An explanation could be provided by the fact that the age of development is different between the 2 groups of plaques. Indeed, carotid plaques seem to be observed sooner than femoral plaques with a prevalence of lipid core plaques [28].

In conclusion, carotid plaques, less calcified than femoral specimens, express more frequently OPG, this expression being correlated with the abundance of macrophages population. The OPG/RANK/RANKL molecular triad may therefore play a role in the differential calcification in carotid and femoral plaques however its intervention remains unclear.

Acknowledgements

We thank Christine Peron and Marie-Françoise Bardin for their excellent assistance.

References

- [1] Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification : an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286 : E686-696.
- [2] Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 2004 ; 95 : 1046-57.
- [3] Virmani R, Burke AP, Farb A et al. Lessons from sudden coronary death : a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 ; 20 : 1262-1275.
- [4] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006 ; 86 : 515-581.
- [5] Ait-Oufella H, Taleb S, Tedgui A. Recent advances of the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 ; 31 : 969-979.
- [6] Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification. Pathobiological mechanisms and clinical implications. *J Circ Res* 2006 ; 99 : 1044-1059.
- [7] Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L et al. RANKL, RANK, Osteoprotegerin : key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64 : 2334-50.
- [8] Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 ; 22 : 549-53.

- [9] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999 ; 397 : 315-23.
- [10] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998 ; 12(9) : 1260-1268.
- [11] Benslimane-Ahmim Z, Heymann D, Dizier B et al. Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *J Thromb Haemost* 2011 ; 9 : 834-43.
- [12] Herisson F, Heymann MF, Chétiveaux et al. Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis*. 2011; 216: 348-354.
- [13] Baud'huin M, Duplomb L, Téletchéa S et al. Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival. *J Biol Chem*. 2009;284:31704-13.
- [14] Zannettino AC, Holding CA, Diamond P et al. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J Cell Physiol* 2005 ; 204 : 714-723.
- [15] Emery JG, McDonnell P, Burke MB et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998 ; 273(23) : 14363-14367.
- [16] Cross SS, Yang Z, Brown NJ et al. Osteoprotegerin (OPG) – a potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis ? *Int J Cancer* 2006 ; 118 : 1901-1908.
- [17] Kim HH, Shin HS, Kwak HJ et al. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB J* 2003 ; 17 : 2163-2165.
- [18] Min JK, Cho YL, Choi JH et al. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand increases vascular permeability : impaired permeability and angiogenesis in NOS-deficient mice. *Blood* 2007 ; 109 : 1496-1502.
- [19] Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritzer C et al. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 ; 90(5): 2964-2971.
- [20] Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritzer C et al. Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis. *Arthritis Rheum* 2004 ; 50 (7) : 2309-16.
- [21] Burton DG, Giles PJ, Sheerin AN et al. Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells : a link to atherosclerosis and vascular classification. *Exp Gerontol* 2009 ; 44 : 659-665.
- [22] Schoppet M, Kavurma MM, Hofbauer LC, et al. Crystallizing nanoparticles derived from vascular smooth muscle cells contain the calcification inhibitor osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 ; 407 (1) : 103-7.
- [23] Haufbauer L, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular disease. *JAMA* 2004 ; 292 : 490-495.
- [24] Shioi A, Katagi M, Okuno Y et al. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells : roles of tumor necrosis factor- α and oncostatin M derived

from macrophages. *Circ Res* 2002 ; 91 : 9-16.

[25] Tintut Y, Patel J, Territo M et al. Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification *in vitro*. *Circulation* 2002 ; 105 : 650-5.

[26] Van campenhout A, Colledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009 ; 204 (2) : 321-9.

[27] Nadra I, Mason JC, Philippidis P et al. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways : a vicious cycle of inflammation and arterial calcification ? *Circ Res* 2005 ; 96 : 1248-56.

[28] Dalager S, Paaske WP, Kristensen IB et al. Artery-related differences in atherosclerosis expression : implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke*. 2007 ; 38 (10) : 2698-705.

Table 1: Immunoreactivity of atheroma plaques to anti-OPG, anti-RANK, anti-RANKL and anti-CD68 antibodies

Patients	Gender	Bed	Immunostaining			
			OPG	RANK	RANKL	CD68
1	M	C	+, calcifications	+, LC, calcifications, MC	++, calcifications, EC, MC	++
2	M	C	+, calcifications	+, LC	+, calcifications, LC	++
3	M	F	-	++, LC, EC	++, calcifications, LC	+
4	M	C	+, LC	++, LC, EC, MC	+, LC, EC, MC	+++
5	F	C	+, LC	++, LC, EC, MC	++, LC, EC, MC	+++
6	F	C	+, LC	++, LC, EC, MC	++, LC, EC, MC	++
7	M	F	-	++, calcifications, LC, EC, MC	+, EC	+
8	M	C	+, LC	+, LC, MC	++, LC, EC, MC	++
9	M	C	-	+, LC, MC	+, calcifications, EC	++
10	M	F	-	+, calcifications	+, calcifications, EC	+
11	M	F	++, calcifications and EC	+, LC, EC, MC	+, calcifications, EC	+
12	F	F	-	++, calcifications	+, EC	+
13	M	C	+, EC and VSMC	++, LC, EC, MC	++, calcifications, EC, MC	+
14	M	C	++, LC, calcifications, MC	++, LC, MC	++, calcifications, EC, MC	++
15	M	C	+, calcifications	++, LC, MC	++, calcifications, LC, EC, VSMC	++
16	M	C	+, VSMC	+, LC, MC	++, LC, EC, MC	++
17	M	C	++, LC, VSMC	++, LC, EC, MC, VSMC	++, calcifications, LC, EC, MC	++
18	M	C	++, LC, EC, MC	++, LC, EC, MC, VSMC	++, LC, EC, MC	++
19	M	F	++, calcifications and EC	+, calcifications	++, calcifications, EC, MC	+
20	M	C	-	++, LC, EC, MC	+, calcifications, EC, VSMC	+
21	F	F	++, calcifications, EC	+++, calcifications, MC, OC	++, calcifications, EC, MC	+
22	M	C	+, LC	++, LC, EC, MC	++, calcifications, EC, MC, VSMC	++
23	M	F	++, calcifications, EC, MC	+, EC	++, calcifications, EC, MC	+
24	F	C	+, calcifications, LC	++, calcifications, EC, MC	+, calcifications, EC, VSMC	++
25	M	F	++, calcifications, EC, MC	+, LC, MC, OC	++, calcifications, EC, MC	+
26	M	C	-	++, calcifications, LC, MC	++, calcifications, EC, MC	+
27	M	C	-	+, LC, MC	++, LC, EC, MC	+++
28	M	C	-	+, MC	+, MC	++
29	F	F	++, calcifications, EC, MC	+, calcifications	-	+
30	M	F	+, calcifications, EC, MC	++, calcifications, EC	++, Calcifications, EC, MC	+
31	M	C	-	+, calcifications	+, calcifications, EC	+

32	M	F	+, EC, MC	+, EC, VSMC	+, calcifications, EC, MC	+
33	M	F	+, calcifications, EC	+++, calcifications, EC, MC, VSMC	++calcifications, EC, VSMC	+
34	M	F	-	+, EC, VSMC	+, VSMC	-
35	M	F	-	++, calcifications, LC, EC, MC, VSMC	++, calcifications, EC, VSMC	+
36	M	F	-	+, calcifications	++, calcifications, EC, VSMC	+
37	M	F	-	++, calcifications, MC	++, calcifications, EC, VSMC	+
38	M	F	-	+, calcifications	+, VSMC	+
39	F	F	-	-	++, calcifications, EC, VSMC	+
40	F	F	+, calcifications	+++, EC, MC, VSMC	++, calcifications, EC, VSMC	+

LC : lipid core ; EC : endothelial cell ; VSMC : vascular smooth muscle cell ; MC : macrophage ; OC : osteoclast

(-) absence or negligible signal ; (+) weak signal ; (++) moderate signal ; (+++) strong signal

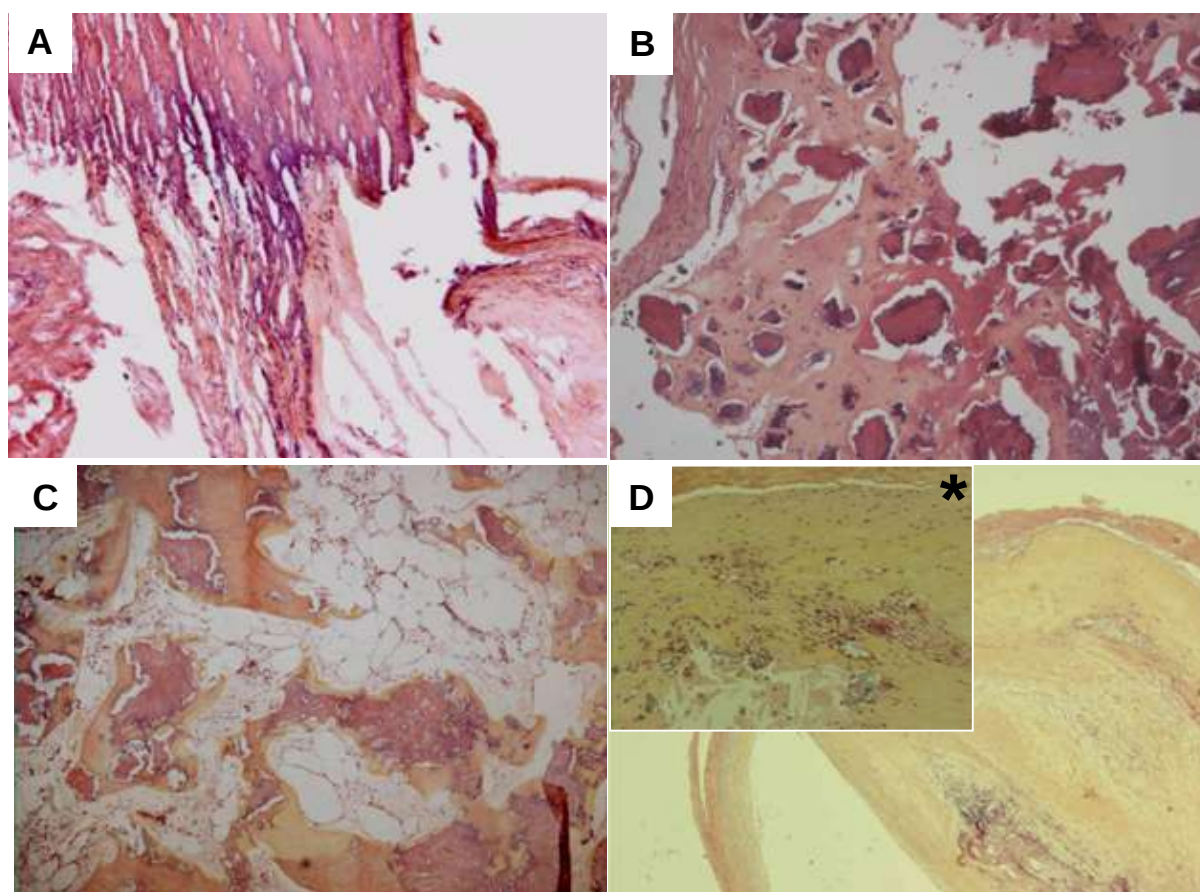


Figure 1 : Carotid and femoral plaques exhibit differential histologic morphologies. A: Femoral plaque with sheet-like calcification; **B:** Nodular calcifications in femoral plaque ; **C :** osteoid metaplasia often observed in femoral plaque; **D:** Carotide plaque with sheet-like calcification, *: Lipid core with microcalcifications. HES staining, original magnification: X20 (**A**); X10 (**B-C-D**).

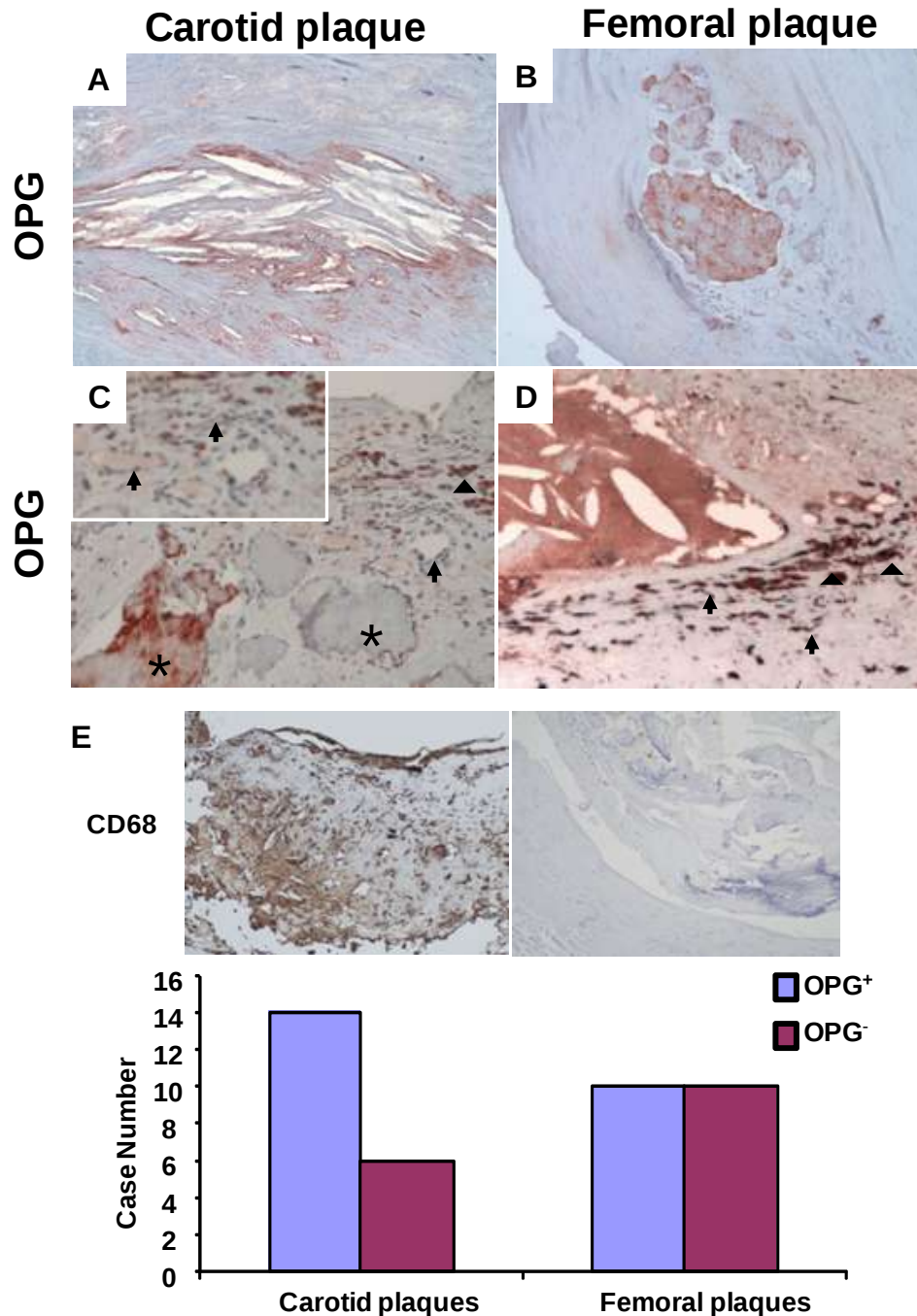


Figure 2: OPG staining is more frequently observed in carotid plaques than in femoral plaques and also in arteries containing less calcified. OPG expression was studied by immunohistochemistry in carotid plaques (A,C) and in femoral plaques (B;D). **A:** OPG positive staining in lipid core with cholesterol crystals; **B:** OPG is expressed by endothelial cells (arrow) and calcified matrix (*); **C:** femoral nodular calcification showing OPG immunostaining; **D:** OPG expressed in endothelial cells (arrow) and macrophages (arrow head). **E:** OPG positivity is closely related to the presence of CD68⁺ between carotid and femoral plaques. Original magnification: X20 (A, D); X10 (B, D).

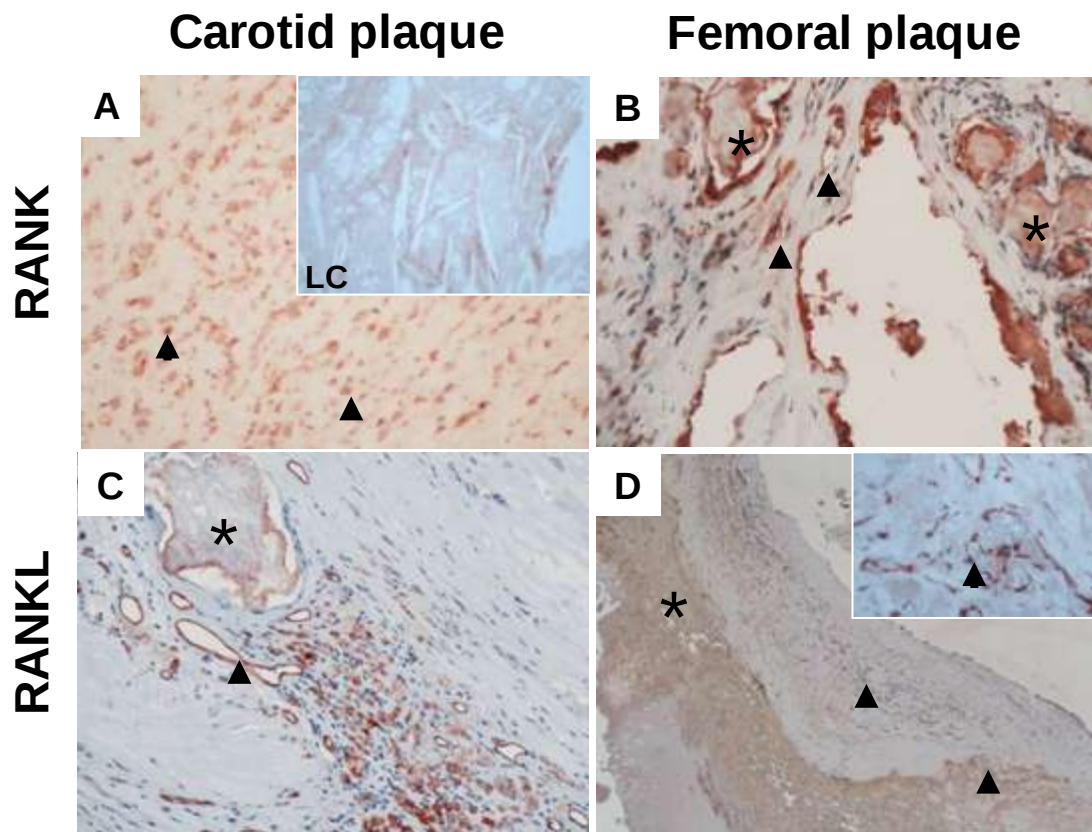


Figure 3: RANK and RANKL are similarly expressed in carotid and femoral plaques.

RANK and RANKL expressions were studied by immunohistochemistry in carotid plaques (A,C) and in femoral (B-D). **A** : RANK positive expression in macrophages (arrow) and in lipid core (LC) ; **B** : RANK positive expression in calcifications (*) and vessels (arrow); **C**: RANKL immunostaining in calcifications (*) and vessels (arrow), some macrophages are also positively stained; **D**: RANKL immunolocalization in calcification (*) and vessels (arrow). Original magnification: X40 (A), X20 (B), X10 (C-D).

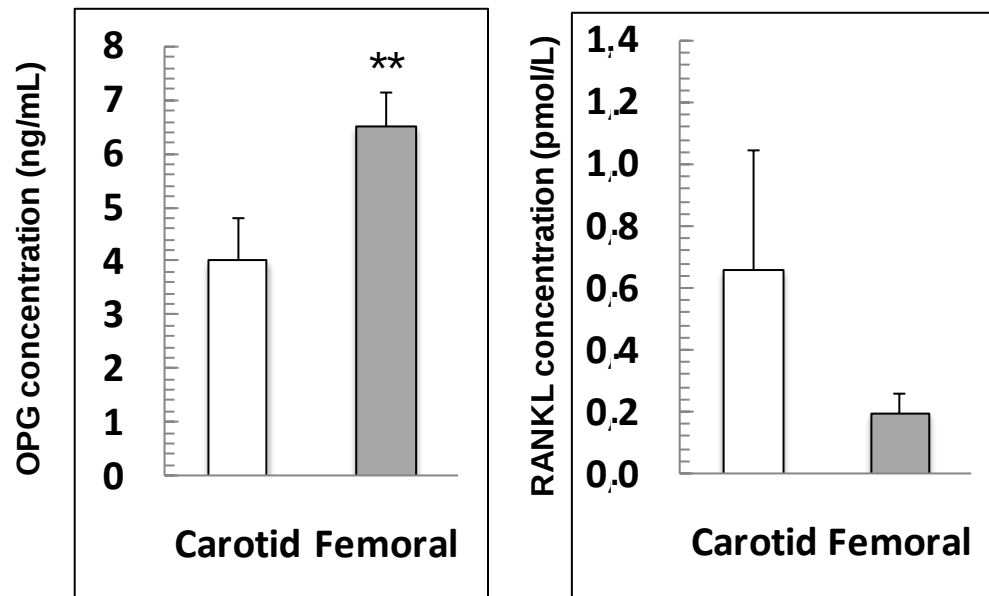


Figure 4: Differential concentration in serum OPG between carotid and femoral populations. Serum OPG was measured by ELISA assay. ** $p < 0.02$.

Supplementary data 1: Primary antibodies used in the immunohistochemical study

Antigen studied (immunogen used)	Antibody (host)	Source	Dilution
RANK (NS50 derived human RANK extracellular domain)	Polyclonal (goat)	R&D Systems	1/35
RANKL (<i>sf</i> 21-derived human RANKL)	Polyclonal (goat)	R&D Systems	1/20
OPG (<i>sf</i> 21-derived human OPG)	Polyclonal (goat)	R&D Systems	1/10
CD68 (Splenic cells isolated from a patient with Gaucher's disease)	Monoclonal (mouse)	Beckman Coulter	1/60

III. Discussion

Une différence de morphologie entre les plaques athéromateuses touchant deux lits artériels différents en matière d'artériopathie périphérique a pu être démontré (Hérisson et *al* 2011). Les plaques fémorales sont plus calcifiées et les plaques carotidiennes plus fibrolipidiques et inflammatoires renfermant une population macrophagique abondante. Les plaques carotidiennes expriment plus fréquemment l'OPG par rapport aux fémorales, cette expression étant corrélée avec un abondant infiltrat macrophagique (article 2). L'OPG semble donc jouer un rôle dans la différence de calcification des plaques carotidiennes et fémorales. Le macrophage est une cellule clé dans la pathogénèse de la plaque athéromateuse : il participe à la dysfonction endothéliale, active la cellule endothéliale et les cellules musculaires lisses par le biais de cytokines et participe à la formation de la bouillie athéromateuse par le biais de l'efférocytose, défailante à des stades avancés de la plaque. Son rôle est donc majeur dans la vulnérabilité de cette plaque d'autant plus que la cellule spumeuse, dérivée en grande partie du macrophage induit l'apoptose des cellules musculaires lisses responsables de la production de collagène au sein la plaque athéromateuse (la coiffe fibreuse est alors plus mince). Dans les plaques calcifiées, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses sont capables de produire de l'OPG et du RANKL dont le déséquilibre d'action oriente soit vers la calcification de la plaque (prédominance de l'action de l'OPG sur les macrophages) soit vers une calcification moins marquée (prédominance de l'action de RANKL) (Montecucco et *al* 2007). Comme nous l'avons montré dans cet article, les plaques carotidiennes expriment plus d'OPG que les fémorales qui sont plus calcifiées. L'OPG semble donc avoir *in situ* un rôle protecteur de la plaque contre le processus de calcifications. Les calcifications de la plaque athéromateuse peuvent être dues à la sénescence des cellules musculaires lisses, les calcifications entraînant une progression des lésions athéromateuses (Burton et *al* 2009). L'OPG est capable d'inhiber directement la calcification des cellules musculaires lisses. En effet, l'OPG qui est présente dans les vésicules produites par l'apoptose des cellules musculaires lisses limite la minéralisation et le dépôt de hydroxyapatite dans la paroi vasculaire (Schoppet et *al* 2011). La forte expression d'OPG dans les artères carotidiennes est corrélée à une importante inflammation de la plaque et notamment à de nombreux macrophages CD68⁺. L'OPG peut être donc responsable du recrutement des macrophages (Mosheimer et *al* 2005). L'OPG pourrait donc initier le processus d'athérosclérose en modulant l'adhérence des monocytes avec les cellules

endothéliales et leur extravasation dans la paroi vasculaire. En complément de cette activité chimiotactique, il est possible d'envisager une modulation du métabolisme des autres cellules de la paroi vasculaire (cellules musculaires lisses, fibroblastes, etc) par l'interaction de l'OPG avec des protéoglycanes membranaires par exemple ou par son rôle inhibiteur de TRAIL. L'OPG peut ensuite intervenir en contrôlant de façon indirecte le processus de minéralisation. En effet, en bloquant RANKL et l'ostéoclastogenèse associée, l'OPG pourrait agir comme un facteur anabolique des plaques athéromateuses.

L'expression d'OPG et RANKL est régulé par de nombreux médiateurs biologiques de type cytokinique impliqués eux-mêmes dans la mise en place et l'entretien de la réaction inflammatoire. Ces cytokines contribuent donc à la genèse des plaques athéromateuses. Ces cytokines sont des protéines de bas poids moléculaire qui interagissent entre les cellules des organes lymphoïdes et les tissus siège d'inflammation. Ce groupe de molécules comprend plusieurs centaines de facteurs sécrétés rangés en différents sous-groupes qui sont les interleukines (IL) (37 sont jusqu'à ce jour connus), les TNF, les interférons (INF), les CSF, les TGF et les chimiokines. Toutes ces molécules sont impliquées dans différents processus physiologiques et sont importants pour réguler les réponses inflammatoires et immunes (innée et adaptative). Toutes les cellules impliquées dans l'athérosclérose sont capables de produire et de répondre à des cytokines. Une pléthore de cytokines a été mise en évidence dans les plaques athéromateuses (Table 4).

Tableau 4 : Cytokines exprimées dans la plaque athéromateuse (Ait Oufella et al 2011)

Cytokines	Protein	mRNA
TNF- α	+	+
IL-1	+	+
IL-2	+	+
IL-4	+/-	+/-
IL-5	+/-	+
IL-6	+	+
IL-8	+	+
IL-10	+	+
IL-12	+	+
IL-15	+	+
IL-17	+	+
IL-18	+	+
IL-20	+	
IL-21	+	+
IL-23	+	+
IL-27	+	
IL-33	+	+
IL-35	+	
IFN- γ	+	+
TGF- β	+	+
GM-CSF	+	+
M-CSF	+	+

Ces différentes molécules contrôlent pour la plupart l'expression d'OPG et RANKL et constituent un réseau moléculaire complexe dans lequel il est difficile de définir les effecteurs initiateurs, des effecteurs terminaux. Les effets biologiques des cytokines peuvent être variés au sein de la plaque. Une partie des effets décrits ci-dessous sont également partagée par l'OPG et RANKL :

- **Implication dans le dysfonctionnement endothélial.** Dans les stades les plus précoces, Le TNF- α et l'INF- γ altèrent la distribution des complexes endothéliaux cadherine-Caténine et prévient la formation de fibres de stress F-actin (Kleinbongard et al 2010). Le TNF- α augmente le Ca² cytosolique et active la myosin light chain kinase et la RhoA qui perturbent les jonctions endothéliales. (Komarova et al 2010).

- **Effet sur l'adhésion leucocytaire et la création de cellules spumeuses.** La restructuration des jonctions intercellulaires qui perdent leur fonction de barrière facilite la migration leucocytaire. Les cytokines induisent également l'expression

de chimiokines et de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium. Le phénomène de recrutement est alors favorisé ainsi que l'étape d'adhésion, et de migration des lymphocytes et monocytes dans la paroi vasculaire inflammatoire (Weber et *al* 2008). Une fois dans l'intima, les monocytes sont activés par différentes cytokines qui accélèrent leur transformation en cellules spumeuses. Cette transformation peut se faire grâce à la stimulation de l'expression des récepteurs scavenger et en augmentant l'oxydation cellulaire.

- **Effet sur la stabilité de la plaque.** A des stades plus avancés de la plaque, les cytokines proinflammatoires la déstabilisent en entraînant l'apoptose cellulaire et la dégradation de la matrice extracellulaire. L'apoptose macrophagique est responsable comme on l'a déjà vu de la formation de la bouillie athéromateuse. L'apoptose des cellules musculaires lisses entraînent un amincissement de la coiffe fibreuse de la plaque, entraînant la rupture de celle-ci (Mallat et *al* 2001, Tabas et *al* 2005, Clarke et *al* 2006). Les cytokines responsables de l'apoptose macrophagique et des cellules musculaires lisses agissent en synergie (association de l'IL-1, TNF- α et l'INF- γ) (Stoneman et *al* 2009). En ce qui concerne la matrice extracellulaire, certaines cytokines inhibent la synthèse de ses constituants. L'INF- γ inhibe par exemple la synthèse du collagène (Amento et *al* 1991). L'IL-1 et le TNF- α sont elles responsables de la production de MMP comme MMP-1, -3, -8 et -9. L'IL-4 produite par les Th-2 inhibe elle la production de la plupart des MMP produites par les macrophages mais induit la production de MMP-12 qui lyse les fibres élastiques (Shimizu K et *al* 2004). Enfin, les cytokines altèrent les propriétés anti-thrombogènes de la cellule endothéliale (Esmon et *al* 2004) ; cela entraîne la formation de thrombus et permet la survenue de zone d'ischémie. L'intervention des cytokines aboutit donc à la genèse de la plaque athéromateuse, puis à ses complications qui font perdurer le remodelage vasculaire. (Figure 23).

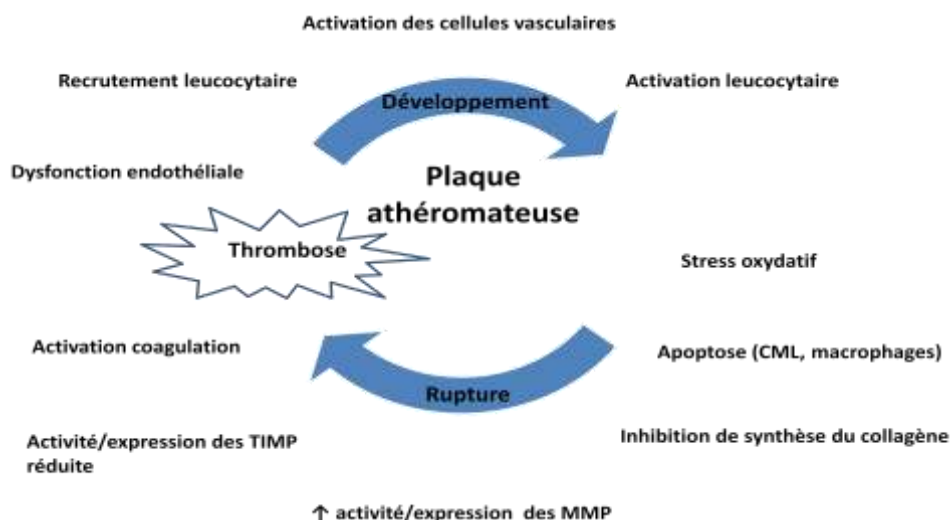


Figure 23 : Effets des cytokines sur le développement de la plaque et sur sa vulnérabilité (d'après Ait Oufella et al 2011)

Pour résumé, les lymphocytes T, recrutés lors de l'athérogenèse produisent de l'OPG et du RANKL qui attirent les monocytes/macrophages dans la paroi vasculaire. Ces lymphocytes produisent également de l'IFN- γ et induisent la différenciation de ces macrophages qui produisent en retour des cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) et des facteurs de croissance (IGF-1, TGF- β) facilitant la différenciation ostéogène des cellules vasculaires (Tintut et al 2000, Watson et al 1994, Parhami et al 2002, Radcliff et al 2005). Aussi bien au niveau sous-intimal (rôle par exemple de l'OPG sur les cellules endothéliales) qu'au niveau de la média (chimiotactisme de l'OPG), la formation des calcifications vasculaires fait intervenir un panel de médiateurs inflammatoires et l'accumulation de ces calcifications génère en retour un environnement micro-inflammatoire. L'ensemble aboutit à un cercle vicieux entre inflammation et calcifications vasculaires (Six et al 2010).

La liste des cytokines mentionnées ci-dessus est loin d'être exhaustive. Ainsi par exemple, l'IL-34 a été découverte, cytokine en étroite relation avec la population macrophagique. Elle assure la survie des monocytes et facilite leur différenciation (Lin et al 2008). Elle se fixe sur le même récepteur que le M-CSF, c-fms. Baud'huin et al. ont montré que cette cytokine pouvait se substituer au M-CSF dans l'ostéoclastogenèse induite par RANKL (Baud'huin et al 2010). D'autre part, l'IL-34 est exprimée au niveau de tumeurs comme les tumeurs à cellules géantes (TCG). Les TCG sont des lésions ostéolytiques

pourvues d'une abondante vascularisation et constituées d'un double contingent cellulaire, des cellules géantes et des cellules mononucléées. L'IL-34 pourrait soutenir la formation de ces cellules géantes en complément du M-CSF. Sur le plan moléculaire, l'IL-34 est intimement liée à RANKL et pourrait donc avoir une implication dans l'athérosclérose. Jusqu'à ce jour, aucune publication ne rapporte le rôle de l'IL-34 dans les processus inflammatoire de la plaque athéromateuse. Une recherche d'expression de cette cytokine sur nos deux cohortes de patients pourrait approfondir les différences d'évolution des plaques.

Discussion générale et conclusions

Il est désormais établi que les calcifications vasculaires font suite à un processus régulé qui ressemble en de nombreux points à l'ossification physiologique. Leur régulation oppose des facteurs activateurs et inhibiteurs mais les déterminants cellulaires et moléculaires à l'œuvre ne sont pas actuellement précisément établis. Une hypothèse avancée par Demer et collaborateurs est qu'au sein des vaisseaux, des cellules de type ostéoblastes produisent du tissu osseux (Demer et *al* 2008). Ces cellules ne sont pas clairement identifiées chez l'homme. Elles pourraient provenir de la reprogrammation du phénotype d'une sous-population de CML de la paroi, appelées calcifying vascular cells (CVC), de péricytes quiescents dans la paroi des artères ou de cellules souches ostéoprogénitrices circulantes (Johnson et *al* 2006) (Figure 24). L'analyse de l'implication de ces cellules dans le processus athéromateux revêt donc un intérêt majeur et permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

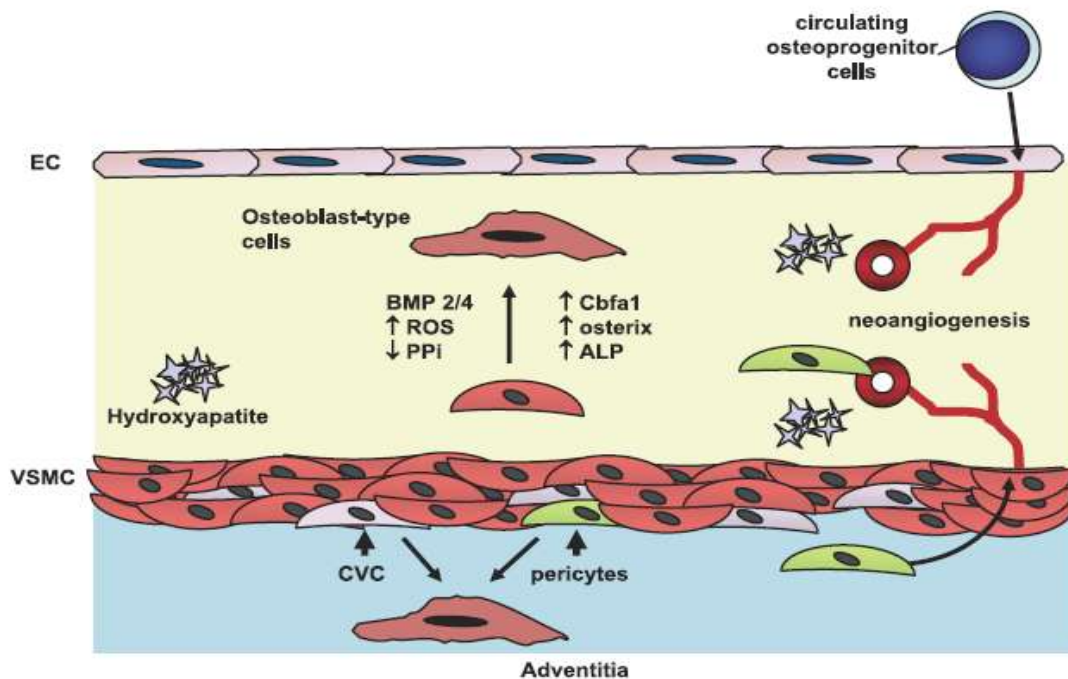


Figure 3 : Origine des cellules osteoblast-like responsables de la calcification vasculaire (Johnson et *al* 2006). Les cellules musculaires lisses et notamment une sous-population de CML appelée CVC, les péricytes quiescents de la paroi et les cellules ostéoprogénitrices circulantes.

Cellules musculaires lisses vasculaires

Les cellules musculaires lisses vasculaires entreprennent une dédifférenciation vers un phénotype ostéoblastique sous l'action de protéines comme les BMP-2 et BMP-4. Ces dernières sont exprimées respectivement par les cellules endothéliales exposées à divers stress (hypoxie, radicaux libres, turbulences du flux sanguin, hypertension, inflammation) et par les

cellules spumeuses stimulées par les lipoprotéines oxydées type LDL (Six et *al* 2010, Johnson et *al* 2006). Les cellules musculaires lisses vasculaires expriment alors des marqueurs de différenciation ostéoblastique comme la BMP-2 et les facteurs de transcription Cbfa1 ou RUNX-2 et Osterix, en même temps qu'elles perdent leurs marqueurs spécifiques de cellules musculaires lisses (Six et *al* 2010, Johnson et *al* 2006, Tintut et *al.* 2003). Il existe dans la paroi artérielle une sous-population de cellules musculaires lisses, les CVC, qui en culture forment spontanément des nodules et minéralisent. Ces CVC expriment alors des protéines osseuses telles l'alkaline phosphatase (ALP), l'ostéocalcine, l'ostéopontine (OPN). Elles conservent une capacité de pluripotence et représenteraient 20 à 30% de l'ensemble des cellules musculaires lisses de la paroi (Tintut et *al* 2003). La minéralisation peut survenir également à la suite de l'apoptose des cellules musculaires lisses vasculaires. En conditions physiologiques, les cellules musculaires lisses sont protégées des calcifications par des protéines inhibitrices des calcifications telles la MGP, la fetuin-A ou l'OPG. En cas d'agression, les cellules musculaires lisses peuvent mourir par apoptose libérant ainsi des corps apoptotiques qui constituent des vésicules matricielles prominéralisantes formant un environnement fermé propice à la minéralisation (Abedin et *al* 2004, Six et *al* 2010, Proudfoot et *al* 2000). Ces vésicules concentrent le calcium et le phosphate pour former des cristaux phosphocalciques (Proudfoot et *al* 2000).

Péricytes

Les péricytes sont des cellules allongées, entourant la membrane basale des vaisseaux. Initialement, ils ont été observés au niveau des microvaisseaux où ils forment une couche cellulaire sous-endothéliale (Andreeva et *al* 1998, Tilton et *al* 1991, Diaz-Flores et *al* 1991, Shepro et *al* 1993). Des travaux histologiques à partir d'artères humaines obtenues lors d'autopsies ont montré que les péricytes étaient également présents au niveau des artères de petit, moyen et gros calibres (Andreeva et *al* 1998). Au niveau des gros vaisseaux, les péricytes sont retrouvés dans la partie interne de l'intima, dans la moitié externe de la média et au sein de l'adventice où ils sont aussi dénommés myofibroblastes adventitiels. Leur proportion a été évaluée à $32.7 \pm 5.9\%$ de la totalité des cellules présentes au sein de l'intima, puis leur présence décroît dans la média et l'adventice. Il existe de grandes variations selon les organes : les vaisseaux rétiens contiennent des péricytes et des cellules endothéliales dans un ratio de 1/1, alors qu'au niveau du muscle strié le ratio est de 1/100 (Shepro et *al* 1993). L'origine embryologique des péricytes n'est pas complètement connue. Ils dériveraient

de la crête neurale ainsi que du mésoderme tout comme les cellules musculaires lisses vasculaires. Les cellules périvasculaires (péricytes et cellules musculaires lisses) et les cellules endothéliales auraient un précurseur commun (Hu et *al* 2004, Yamashita et *al* 2000). Les péricytes jouent un rôle fondamental dans la vasculogenèse et l'angiogenèse. Ils sont nécessaires au bon développement des vaisseaux. Ils possèdent une capacité de contraction influençant le diamètre et la perméabilité des vaisseaux et confèrent un support mécanique à la paroi en contractant des liaisons avec les cellules endothéliales et en participant à la synthèse de la membrane basale (Diaz-Flores et *al* 1991, Sims et *al* 1991, Doherty et *al* 1999, Gerhardt et *al* 2003). Les péricytes sont des cellules largement impliquées dans des pathologies microcirculatoires tels que le diabète, l'inflammation, la cicatrisation, l'hypertension et la néoplasie. Les péricytes sont des cellules pluripotentes capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, cellules musculaires lisses ou adipocytes notamment (Diaz-Flores et *al* 1991, Doherty et *al* 1999). Récemment des travaux de Master 2 (JM Davaine-U957) ont montré la capacité des péricytes à se différencier en ostéoblastes en milieu inducteur. En effet, les péricytes sur-expriment fortement le facteur de transcription Cbfa1, spécifique de la lignée ostéoblastique, par rapport à son niveau d'expression basal. Les mêmes constatations ont été faites concernant l'ALP, protéine spécifique de la minéralisation. Les péricytes ont donc la capacité de se différencier en cellules de type ostéoblastique produisant une matrice minéralisée. Ces péricytes ont également une action sur les cellules souches mésenchymateuses ostéogéniques ainsi que sur l'ostéoclastogénèse. En effet, des surnageants péricytaires inhibent la minéralisation des cellules souches mésenchymateuses ainsi que l'ostéoclastogénèse. De façon intéressante, ces péricytes humains expriment OPG à l'état basal, les ARNm de RANK et RANKL étant retrouvés en très faible quantité. Sous l'influence de diverses cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , l'expression des trois molécules est augmentée. Le péricyte pourrait donc jouer un rôle dans le mécanisme d'action de la triade OPG/RANK/RANKL au niveau de la plaque athéromateuse et par la même dans le mécanisme de calcification de la plaque. Toutes ces propriétés font du péricyte le candidat idéal pour établir le lien entre calcifications vasculaires et angiogenèse. Les néovaisseaux sont présents en abondance au sein des plaques d'athérome et des calcifications artérielles (Kamat et *al* 1987). Tout comme lors de l'ossification endochondrale où l'arrivée de bourgeons vasculaires permet l'ossification, l'angiogenèse contemporaine du développement de l'athérosclérose joue certainement un rôle clé dans la formation des calcifications vasculaires. Les néovaisseaux formés peuvent servir de voie d'apport de cytokines inflammatoires, de facteurs de croissance et de cellules ostéoprogénitrices. Au cours de l'ossification

endochondrale, des bourgeons vasculaires permettent la colonisation de la trame cartilagineuse par les ostéoblastes et l'ossification. Un même processus pourrait être à l'origine de la minéralisation de la paroi artérielle. Des travaux de recherche allant dans le sens d'une meilleure compréhension des phénomènes régulant angiogenèse, calcifications vasculaires et péricytes apparaissent donc d'un grand intérêt.

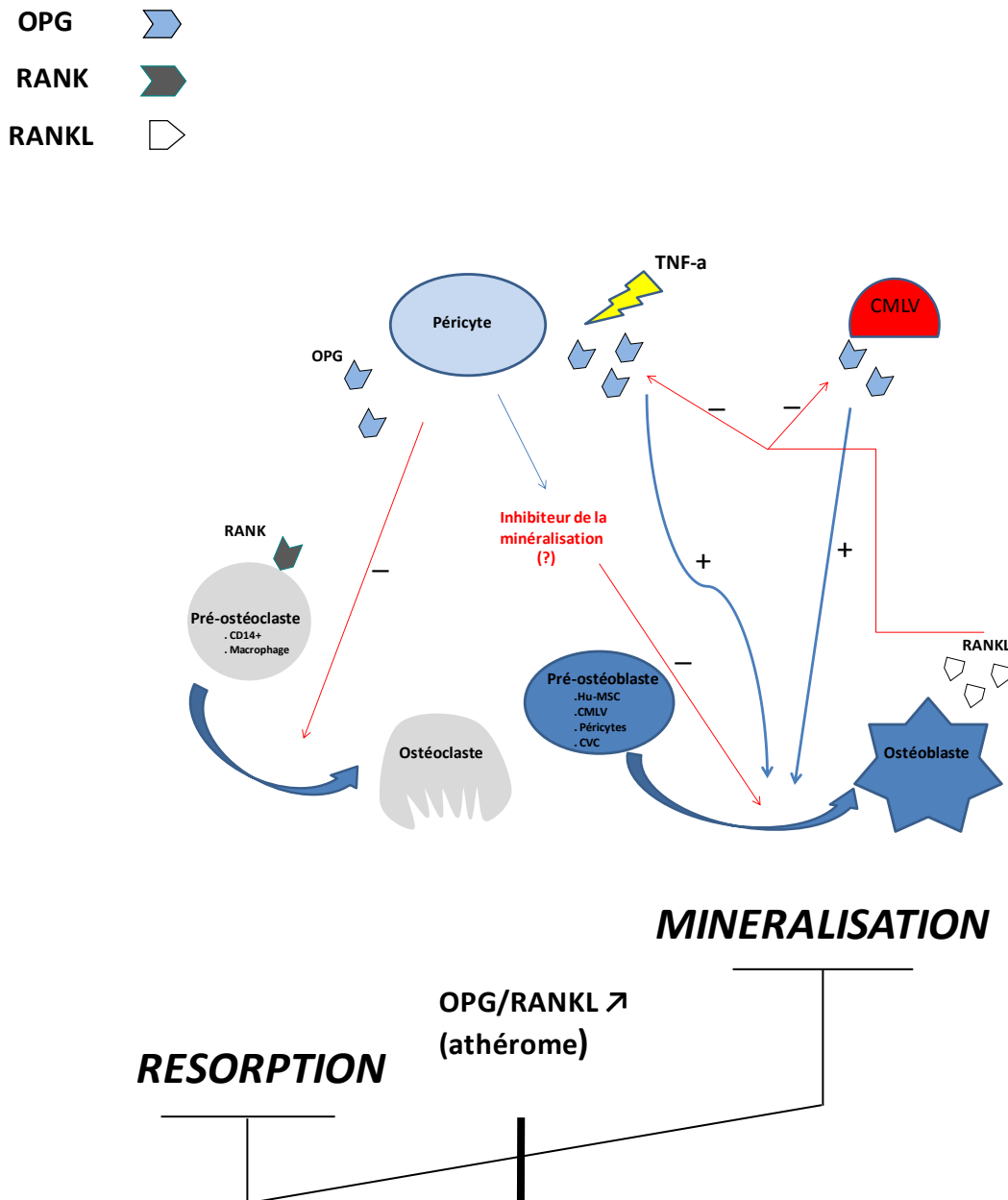


Figure 25: Représentation schématique de la minéralisation vasculaire (d'après Davaine et al). Selon leur hypothèse, dans la paroi vasculaire, les péricytes préviennent la formation des calcifications vasculaires en produisant un inhibiteur qui reste à identifier. En cas de stress inflammatoire (TNF- α), les péricytes et les CMLV produisent de grandes quantités d'OPG qui induisent la minéralisation de cellules (Pré-ostéoblastes) capables de se différencier en ostéoblastes. Ces préostéoblastes seraient des CMLV, des péricytes ou des CVC. Les ostéoblastes peuvent à leur tour exprimer du RANKL qui va bloquer l'action d'OPG. Parallèlement, la synthèse d'OPG va inhiber la formation d'ostéoclastes à partir de pré-ostéoclastes (macrophages dans les artères). Il existerait donc dans la paroi artérielle tout comme dans le tissu osseux une balance entre résorption et minéralisation dont l'équilibre dépendrait du ratio OPG/ RANKL.

Nous venons de voir l'importance des éléments inflammatoires, des cellules musculaires lisses, des péricytes, de l'angiogenèse et des cytokines dans la genèse de la plaque athéromateuse et dans le développement des calcifications. Les constituants mêmes tissulaires jouent également leur rôle et notamment le ratio Ca/P. Des études ont également montré que des éléments comme le fer (Fe) et le zinc (Zn) étaient présents dans les lésions athéromateuses humaines (Pallon J et *al* 1995, Lee et *al* 1998) et dans des modèles d'athérosclérose animale (Minqin et *al* 2003, Makjanic et *al* 1999). Pallon et collaborateurs ont décrit des hot spots de Fe et Zn au niveau de la limitante élastique interne de la paroi artérielle. Les travaux sur la colocalisation de ces traceurs avec les calcifications précoces de la paroi artérielle restent peu nombreux ce qui rend leur signification difficile. Roijers et collaborateurs ont montré récemment la présence d'accumulation de Fe et Zn au contact de microcalcifications retrouvées sur des artères coronaires de cadavres (présence dans 75% des cas) (Roijers et *al* 2011). Ceci suggère une relation mutuelle entre ces différents traceurs et les dépôts de sels de calcium. Leur présence dans les stades les plus précoces de l'athérosclérose permet d'évoquer leur rôle dans la genèse et la progression des calcifications vasculaires. Dans notre première étude morphologique comparative entre plaques athéromateuses carotidiennes et fémorales (Herisson et *al* 2011), nous avons déterminé une teneur en Fe différente entre les deux sites, les plaques fémorales étant plus riches en Fe (plus de 2,5 mg/g de plaque versus 1mg/g). Les dépôts de Fe (coloration de Perls) prédominaient au niveau du cytoplasme des macrophages (surtout pour les carotides) et au pourtour des calcifications (Figure 26). Ces résultats concordent avec les données de Roijers et collaborateurs. Des dépôts de Fe sont souvent observés au contact des lésions d'athérosclérose avancées (Lee et *al* 1998, Makjanic et *al* 1999, Stadler et *al* 2004). Les dépôts de Fe sont alors souvent entourés de matériel calcifié au sein de la limitante élastique interne (Pallon J et *al* 1995). Dans la pathogénie de la plaque, le Fe pourrait avoir un rôle de peroxydation des lipides, qui par la suite sont phagocytés par les macrophages ou déposés dans la matrice extracellulaire (Gaut et *al* 2001, Stocker et *al* 2004). Li et collaborateurs ont montré que l'expression forte de ferritine dans les macrophages des plaques était corrélée avec la sévérité des lésions, le tabagisme et la symptomatologie des patients (Li et *al* 2008). Le fait que nos artères fémorales et carotidiennes ne présentent pas la même teneur en Fe souligne encore le fait que le stade d'avancement de ces plaques est différent, avec des fémorales vraisemblablement plus avancées dans la pathologie athéromateuse. Une étude comparée des deux lits artériels sur cadavres pourrait éclaircir cette question.

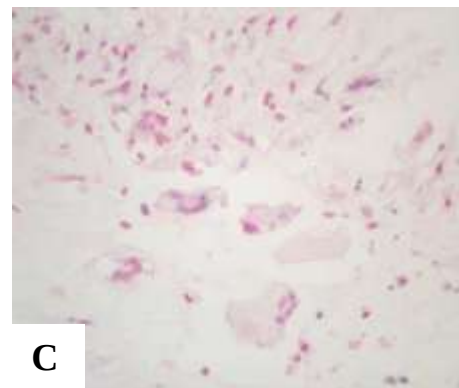
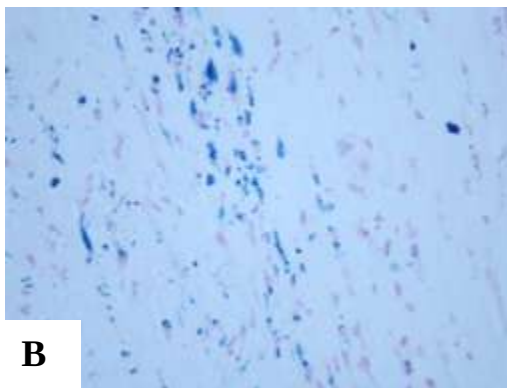
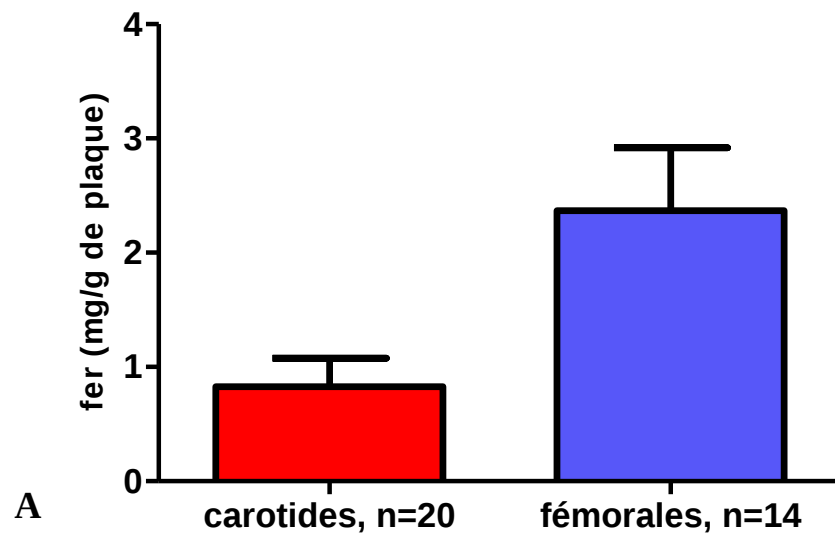


Figure 26 : Fer au sein des plaques athéromateuses

- A) Teneur en Fer des plaques athéromateuses
- B) Marquage des macrophages par le Perls (x 100)
- C) Dépôt de Fer au pourtour des calcifications (Perls, x100)

En conclusion, les plaques athéromateuses carotidiennes et fémorales présentent des morphologies très différentes. Plus particulièrement, les taux calciques de ces plaques, le niveau d'expression d'OPG in situ et les taux sériques d'OPG chez ces patients sont des éléments biologiques différentiels. La triade OPG/RANK/RANKL semble donc jouer un rôle dans les mécanismes de calcification des deux lits artériels. Les plaques carotidiennes et fémorales comportent un taux de calcium différent. Sont-elles parvenues à un même stade de développement ? Cette question représente un biais à nos résultats. Une façon d'y répondre serait l'étude comparative des deux lits vasculaires chez le cadavre (travaux en cours). Les macrophages, les cellules musculaires lisses et les péricytes sont également des éléments clés du processus de calcification de la plaque athéromateuse et sont étroitement associés aux mécanismes d'action de la triade moléculaire au niveau de la paroi artérielle. Des travaux de recherche allant dans le sens d'une meilleure compréhension des phénomènes régulant angiogenèse, calcifications vasculaires et péricytes apparaissent donc d'un grand intérêt et permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Tout ceci peut permettre d'expliquer, du moins partiellement, la différence de resténose que l'on observe après dilatation des deux lits artériels, les resténoses étant 5 fois plus fréquentes pour les artères fémorales. Quelles sont les conséquences pronostiques et thérapeutiques de ces observations ? Il est admis que le caractère calcifié de la plaque est un critère tantôt de stabilité pour les uns, cela étant vrai surtout pour le réseau coronaire (Ehara S *et al* 2004), tantôt de vulnérabilité pour d'autres auteurs (Virmani *et al* 2006). Est-ce que les patients fémoraux ont un pronostic vital péjoratif par rapport à la population carotidienne ? Un suivi des patients aurait pu répondre à cette question, suivi non envisagé lors de la mise en place du protocole ECLA qui ne permet que la photographie à un instant donné de la plaque athéromateuse. Cependant, avec plus d'un an de recul, il ne semble pas y avoir plus de décès dans l'un ou l'autre des groupes de patients.

Enfin, l'utilisation d'un modèle de rat de resténose intrastent pourrait aider à la meilleure compréhension de l'implication de la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL dans la genèse de la plaque athéromateuse ainsi qu'à son implication dans la formation de calcifications vasculaires.

Annexes

OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions

Marie-Françoise Heymann^{a,b,c}, Anne Riet^{a,b}, Benoît Le Goff^{a,b,e}, Séverine Battaglia^{a,b},
Jacques Paineau^d, Dominique Heymann^{a,b,e,*}

^a INSERM, ERI 7, Nantes, F-44035, France

^b Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, EA3822, Nantes, F-44035, France

^c CHU, Hôpital Laënnec, Département de Pathologie, 44093 Nantes, France

^d Centre de Lutte Contre le Cancer, 44800 Saint-Herblain, France

^e CHU, Hôtel Dieu, 44035 Nantes cedex 1, France

Received 29 August 2007; received in revised form 19 December 2007; accepted 13 February 2008

Available online 19 February 2008

Abstract

Receptor activator of NF- κ B (RANK), RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) play essential roles in bone metabolism. RANKL binds to RANK, which is expressed by osteoclasts whereas OPG acts as its decoy receptor blocking the RANK-RANKL interaction. OPG/RANK/RANKL are produced by variety of tissues including epithelial and mesenchymal cells. However, the role of RANKL/OPG in thyroid pathophysiology remains unclear. The aim of this study was to determine the expression pattern of RANK/RANKL/OPG in primary neoplastic thyroid lesions and in lymph node metastases. 27 specimens from total thyroidectomy were studied by immunohistochemistry: 9 papillary carcinomas (PC), 9 medullary carcinomas (MC), 9 macrovesicular adenomas (MA). Immunohistochemical evidence of RANKL was found in 30 % of MC, 22% of PC while RANKL has never been detected in PC. The expression of RANK is closely related to RANKL. OPG was restricted to the cytoplasm of epithelial in 1 MA and 1 MC. In contrast to pathological tissues, any expression of OPG/RANK/RANKL was detected in healthy thyroid tissue. This work reveals for the first time that OPG/RANK/RANKL are expressed in the pathological thyroid gland by follicular cells, by malignant parafollicular cells as well as in metastatic lymph node microenvironment. Thus OPG/RANK/RANKL molecular triad might play a role during pathogenesis of follicular and parafollicular tumors.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Thyroid; Macrovesicular adenoma; Medullary carcinoma; Papillary carcinoma; OPG/RANK/RANKL; Immunohistochemistry

1. Introduction

Osteoprotegerin (OPG) and its cognate ligand, receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL), have been identified as important factors involved in the regulation of bone metabolism mediating the paracrine signaling between osteoblasts and osteoclasts [1–3]. OPG acts as a decoy receptor binding RANKL and thereby inhibiting the interaction between RANKL and its receptor RANK on the osteoclast surface [4]. The deregulation of this molecular triad is in part responsible of the osteolysis associated to malignant tumours, and their develop-

ment in bone site. This molecular triad OPG/RANK/RANKL exerts more specifically its activities in the osteoarticular, immune and vascular systems and furthermore these protagonists constitute the crossroads of immunity and bone metabolism named “osteimmunology” [5,6].

A wide range of tissues (brain, thymus, bone marrow, etc) and cells (lymphocytes, endothelial cells, dendritic cells, etc) produce OPG, RANK and RANKL. Among these production sites, human thyroid follicular cell lines and primary human thyroid follicular cells seem to produce OPG and RANKL. Furthermore, OPG mRNA is more abundant in surgical thyroid specimens of Grave's disease compared to other thyroid diseases [7]. Several recent publications report that OPG and RANKL may be involved in the cross-talking between thyroid function and bone metabolism and that thyroid pathologies strongly affect OPG/RANKL equilibrium.

* Corresponding author. INSERM ERI7, Faculté de Médecine 1 rue Gaston Veil, 44035 Nantes cedex 1, France. Tel.: +33 240 412 845; fax: +33 240 412 860.

E-mail address: dominique.heyman@univ-nantes.fr (D. Heymann).

Thus, hyperthyroidism is accompanied with an increase in serum OPG concentrations related to an excess of thyroid hormones and so accelerates bone turnover [8]. Similarly, in hypothyroid patients, serum OPG concentrations are increased [9] and are normalized with restoration of normal thyroid function [10]. OPG level also correlates with biomarkers of bone metabolism during anti-thyroid treatment in patients with Grave's disease [11]. Mikosch et al. demonstrated that suppressive thyroid hormone therapy in men with differentiated thyroid carcinoma upmodulated bone degradation explained in part by the disturbance of OPG/RANKL balance [12]. Overall, these data evidenced that OPG/RANKL ratio is totally altered in thyroid pathologies but their role in thyroid physiology still remain unclear.

Unfortunately, in spite of these observations, any data are available concerning the potential source of OPG and RANKL in thyroid gland during thyroid carcinogenesis. Indeed, to our knowledge, no report describes the localization of OPG/RANK/RANKL proteins in tumor thyroid tissue. The aim of our study was to determine the RANK, RANK ligand and osteoprotegerin expressions by immunohistochemistry in thyroid tumors classified as macrovesicular adenoma, papillary carcinoma and medullary carcinoma.

2. Materials and methods

2.1. Patients

This study included 27 patients (23 females aged 17–78 years, 4 males aged 30–67 years) that were referred to our institution for the treatment of thyroid pathology. All surgical specimens were classified according to the WHO classification based on histological samples obtained after total thyroidectomy: 9 papillary carcinomas (PC), 9 medullary carcinomas (MC), 9 benign macrovesicular adenomas (BMA). The tumor sizes ranged between 0.5 to 3.5 cm for carcinomas and 1.5 to 8 cm for adenomas. All carcinomas were graded according to the TNM classification: 8 pT1, 7 pT2, 1 pT3 and 2 pT4. Three tumors presented nodes metastasis (2 MC and 1 PC). Hypercalcemia was noted for 1 MA. The experimental procedures followed in the present study were in accordance with the ethical standards of the responsible institutional committee on human experimentation and with Helsinki Declaration of 1975, revised in 1983.

2.2. Immunohistochemistry

All surgical specimens (thyroid tissues and lymph nodes) were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin blocks. For histological investigations, 5 µm-thick sections were stained with haematoxylin–eosin–safran. Immunohistochemical reactions using antibodies raised against RANK, RANKL and OPG (R&D System, Abingdon, UK) were performed on deparaffinized sections (5 µm) for each tumor using the standard avidin–biotin method [13,14]. The tissue sections were treated with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) for 5 min to block endogenous peroxidase and then incubated with corresponding primary antibody, over night at 4 °C in a humidified atmosphere. The primary antibodies used are listed in Table 1. Then slides were

Table 1
Primary antibodies used in the immunohistochemical assays

Antibody against	Source	Type (species)	Immunogen	Dilution used
RANK	R&D Systems catalogue n°AF683	Polyclonal (goat)	NS50 derived human RANKL extracellular domain	1/50
RANKL	R&D Systems Catalogue n°AF626	Polyclonal (goat)	sf 21-derived human RANKL	1/20
Osteoprotegerin	R&D Systems Catalogue n°AF805	Polyclonal (goat)	sf 21-derived human OPG	1/10

incubated 1 h with 1/200 anti-goat biotinylated immunoglobulin (Rockland Immunohistochemicals, Gilbertsville, PA, USA) for OPG, RANKL and RANK studies. All slides were incubated with 1/100 extravidin-peroxidase for 30 min at room temperature, then revealed with an AEC staining kit (Sigma, saint-Quentin Fallavier, France). Preparations were counterstained with hematoxylin, then dehydrated and mounted with Gel Mount (Biomedica, Foster City, CA, USA). All antibodies and extravidin dilutions were prepared in PBS (pH 7.4). Negative control was prepared for each antibody analyzed using a similar procedure excluding the primary antibody.

2.3. Immunohistochemical evaluation

Each case was scored by two independent operators using a semi-quantitative method, evaluating both the heterogeneous positive distribution and the differing intensity of the staining simultaneously. We classified all cases in 4 categories: (–) absence or negligible signal, (+) weak signal, (++) moderate signal.

3. Results

RANK, RANKL and OPG expression have been analyzed by immunohistochemistry in 9 medullary carcinomas (MC) (Fig. 1a), 9 papillary carcinomas (PC) (Fig. 1b), 9 benign medullary adenomas (MA) and in healthy thyroid tissue surrounding all tumors.

3.1. RANK is expressed in a third of benign and malignant tumors of thyroid gland

RANK expression was evidenced in benign and malignant thyroid tissues (Table 2). Indeed, RANK positive staining was observed in 30% of MC (data not shown) and in 30% of PC (Fig. 1c). In both pathologies, RANK immunoreactivity was located in nucleus and cytoplasm of epithelial cells and in one case the colloid was positive (Table 2). In PC, epithelial cells and macrophages expressed similarly RANK in the cytoplasmic domain (Fig. 1c). Furthermore, in 22% of MA, RANK was also positively detected in the nuclei and/or cytoplasm of epithelial cells and in one case in the colloid.

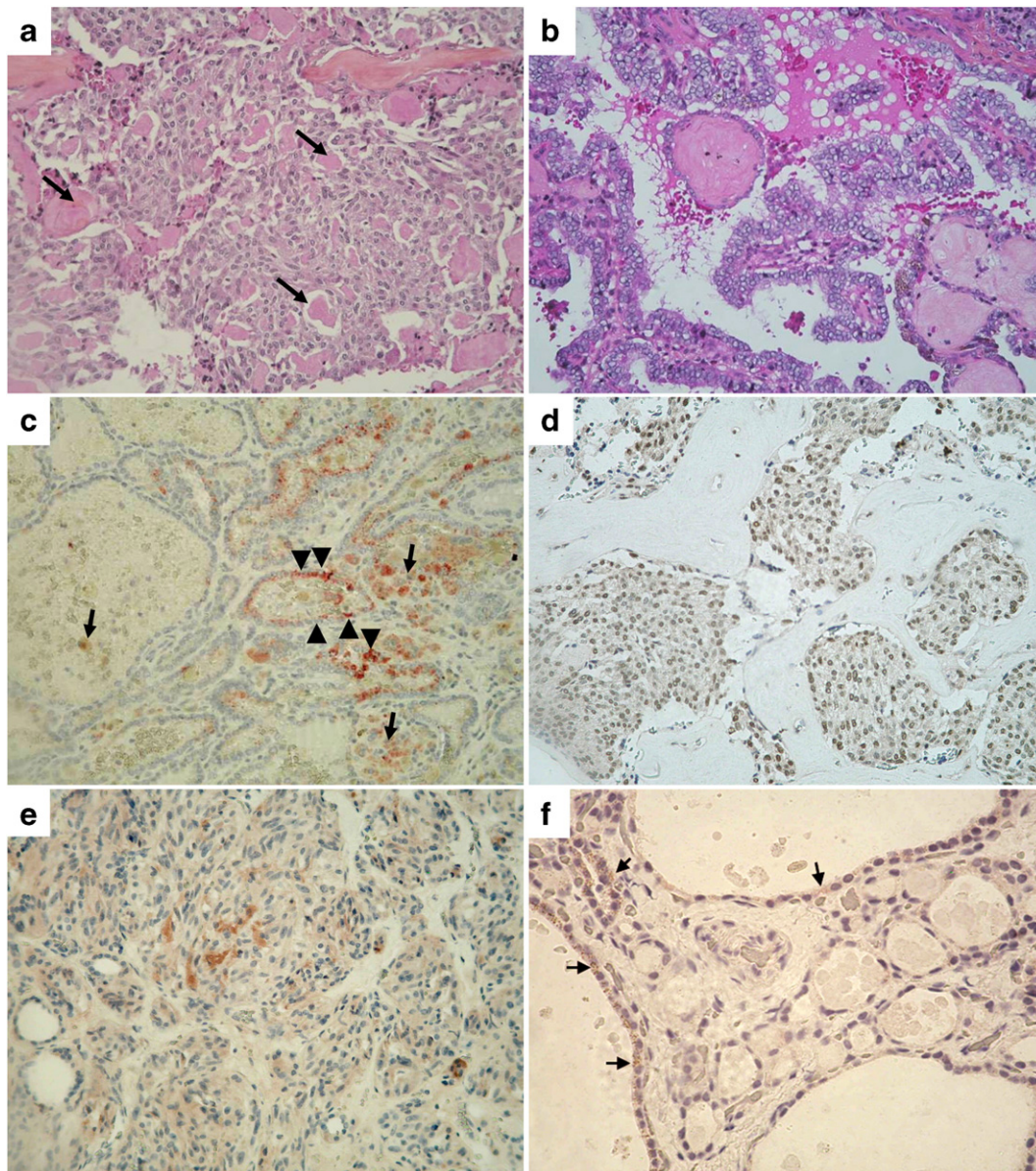


Fig. 1. Histology and immunolocalization of OPG, RANK and RANKL in benign macrovesicular adenomas, papillary carcinomas and medullary carcinomas. f, medullary carcinoma characterized by the presence of amyloid stroma (arrow) (HES staining, original magnification $\times 20$). b, Papillary carcinoma with typical nuclear deformations (HES staining, original magnification $\times 20$). c, RANK positive staining of papillary carcinoma (original magnification $\times 20$). Cytoplasmic expression of epithelial cells (arrow head) and macrophages (arrow). d, RANKL immunoreactivity in medullary carcinoma (original magnification $\times 20$). e, OPG staining in medullary carcinoma (original magnification $\times 20$). f, weak OPG expression in medullary adenoma (original magnification $\times 20$). Abbreviation: HES, hematoxylin, eosin and safran.

3.2. RANKL expression is not detected in papillary carcinomas

RANKL expression was closely related to RANK localization pattern in MC (Table 2). Thus, 30% of MC were positive for RANKL both in the cytoplasm and in nucleus of epithelial cells (Fig. 1d). In contrast, RANKL was never detected in PC and observed in 22% of MA only in the cytoplasm of epithelial cells.

3.3. OPG is exceptionally expressed by benign and malignant tumors of thyroid gland

OPG Immunolocalization was similarly analyzed (Table 2). OPG expression was restricted to the cytoplasm of epithelial

one case of MC (Fig. 1e) and one case of MA (Fig. 1f). Colloid expressed a positive immunoreaction for OPG in one case of MA (Table 2). No correlation between OPG, RANK and RANKL expression and tumor size or node invasion had been observed. Moreover, in contrast to pathological tissues, no expression of OPG/RANK/RANKL was detected in healthy thyroid tissue.

3.4. RANK is expressed in the nucleus tumor cells, OPG in endothelial cells and RANKL in macrophages of lymph node metastasis from MC

Three tumors presented lymph node metastasis (2 MC, patients 16 and 17 and 1 PC, patient 7) (Table 3). Immunolocalization of

Table 2

Immunoreactivity Results (IR) of primary thyroid lesions to anti-RANK, RANKL, OPG antibodies

Patients	Age/Sex	Diagnosis	TNM	IR anti-RANK	IR anti-RANKL	IR anti-OPG
1	17/F	PC	pT4aN0	–	–	–
2	62/F	PC	pT1Nx	++, rare positive epithelial cells	–	–
3	46/F	PC	pT3Nx	–	–	–
4	32/F	PC	pT2N0	++, 1% cyto, epithelial cells, macrophages	–	–
5	78/F	PC	pT2N0	–	–	–
6	37/F	PC	pT1Nx	++, colloid	–	–
7	55/F	PC	pT4N1	–	–	–
8	54/M	PC	pT1Nx	–	–	–
9	48/F	PC	pT1N0	+, 1% macrophages	–	–
10	75/F	MC	pT2N0	+, 10%, cyto epithelial cells	++, 100%, cyto/nuc epithelial cells	–
11	36/F	MC	pT1N0	+, 100% cyto epithelial cells	++, 80% cyto/nuc epithelial cells	100/cyto/+ epithelial cells
12	30/F	MC	pT2N0	+, 100%, cyto epithelial cells	++, 100%, cyto/nuc epithelial cells	–
13	61/F	MC	pT1N0	+, 10% cyto epithelial cells	–	–
14	52/F	MC	pT1Nx	–	–	–
15	39/F	MC	pT2N1	–	–	–
16	56/F	MC	pT2N1	–	–	–
17	67/M	MC	pT2N1	– epithelial cells, + 1% macrophages	–	–
18	55/F	MC	pT1Nx	–	–	–
19	68/F	MA		+, 80% cyto epithelial cells	+, 80% epithelial cells	++, 70% cyto epithelial cells
20	77/F	MA		–	–	–
21	72/F	MA		++ 30% cyto/nuc, epithelial cells	–	+ colloid
22	44/F	MA		++ colloid	++, 50% cyto epithelial cells	–
23	71/F	MA		–	–	–
24	44/F	MA		–	–	–
25	56/F	MA		–	–	–
26	38/F	MA		–	–	–
27	67/F	MA		–	–	–

PC: papillary carcinoma; MC: medullary carcinoma; MA: macrovesicular adenoma. (–) absence or negligible signal, (+) weak signal, (++) moderate signal. Cyto/Nuc: cytoplasmic and nuclear positive staining.

RANK, OPG and RANKL has been compared between node metastasis and primary tumors. No expression of RANK, RANKL was observed in PC lymph node metastasis and a weak signal was detected in the cytoplasm of some tumor cells (Table 3). In the two metastatic lymph nodes from MC, all epithelial cells possessed a positive RANK in their nuclei (Table 3, Fig. 2b and e), while endothelial cells closely associated with tumor cells were positive for OPG in one case (patient 16) (Fig. 2a) and negative for patient 17 (Fig. 2d, Table 3). More interesting, the endothelial distant from tumor cells were negative

for OPG (Fig. 2a insert). Tumor cells or endothelial cells were negative for RANKL and macrophages showed a RANKL positive expression (Table 3).

4. Discussion

It is well known that dysfunctions of thyroid gland causes disturbance of bone turn over especially bone loss. The intimate mechanisms of such interrelation still remain unclear, however the involvement of several proteins has been suspected. Thus, thyroid

Table 3

Immunoreactivity Results (IR) of lymph node metastases from thyroid carcinomas to anti-RANK, RANKL, OPG antibodies

Patients	Diagnosis	IR anti-RANK		IR anti-RANKL		IR anti-OPG	
		Primary tumor	Lymph node metastase	Primary tumor	Lymph node metastase	Primary tumor	Lymph node metastase
7	PC	–	–	–	–	–	– endothelial cells, + cyto rare tumor cells
16	MC	–	+ 100% nuc tumor epithelial cells and lymphocytes	–	– tumor epithelial cells, + macrophages	–	++ endothelial cells, – tumor cells
17	MC	– tumor cells, – epithelial cells, + 1% macrophages	+ 100% nuc tumor epithelial cells and lymphocytes	–	– tumor epithelial cells, + macrophages	–	–

PC: papillary carcinoma; MC: medullary carcinoma. (–) absence or negligible signal, (+) weak signal, (++) moderate signal. Cyto/Nuc: cytoplasmic and nuclear positive staining.

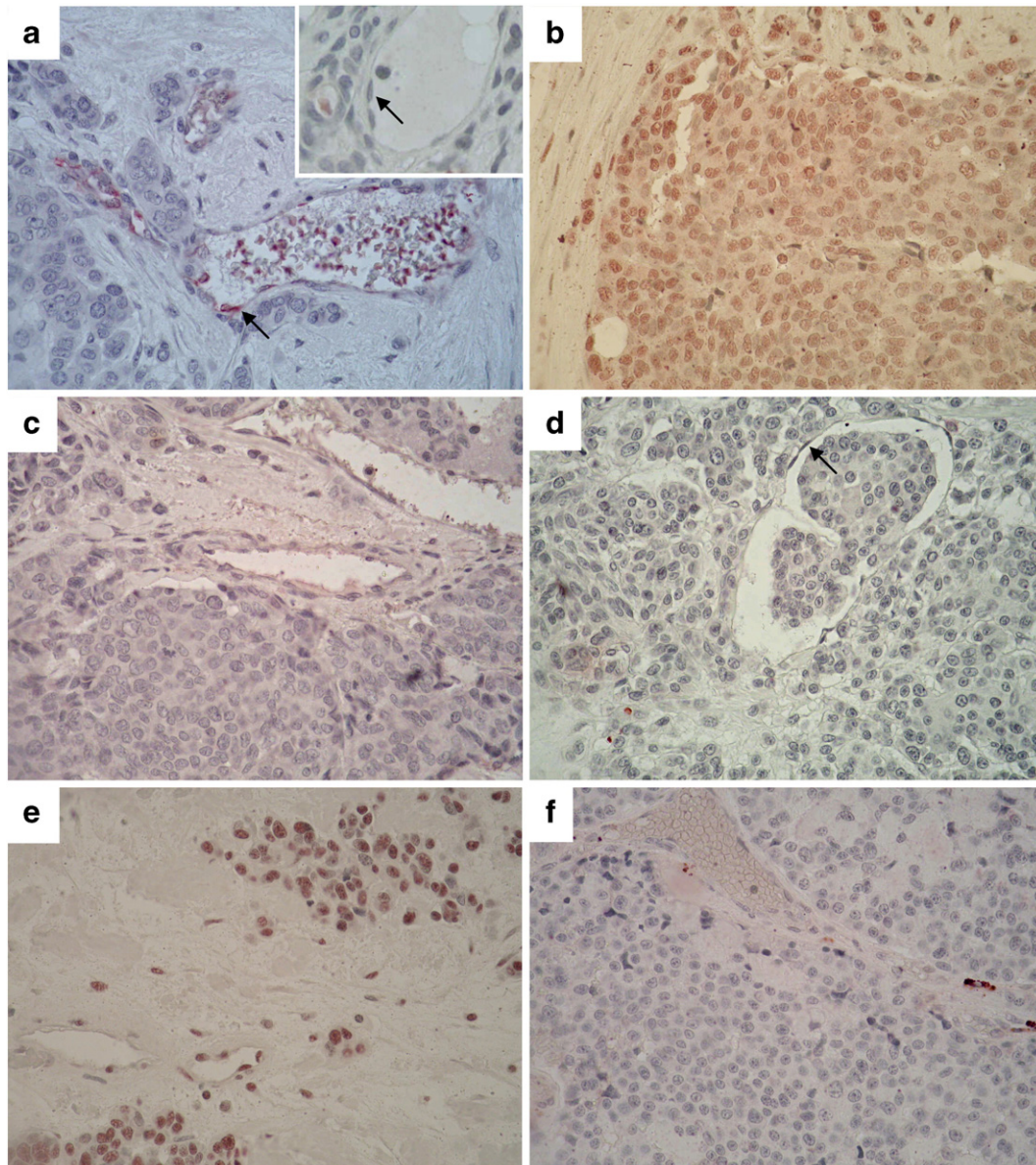


Fig. 2. Immunolocalization of OPG, RANK and RANKL in lymph node metastases from thyroid carcinomas. a, b, c: lymph node metastasis from patient 16 and immunolocalization respectively of OPG, RANK, RANKL. d, e, f: lymph node metastasis from patient 17 and immunolocalization respectively of OPG, RANK, RANKL. a, positive staining of endothelial cells (arrow) located near the tumor cells in contrast to endothelial cells distant from tumor cells (insert). d, negative immunoreactivity of lymph node metastasis of patient 17 to OPG. b, c, positive immunolocalization of RANK in the nuclei of tumor cells. c, f: negative staining of RANKL in tumor cells and endothelial cells. Original magnification $\times 40$.

hormones produced by thyrocytes and stocked into the colloid affect osteoclast differentiation [15–19] as well as calcitonin secreted by parafollicular cells (C cells) [20]. Furthermore, recent investigations in bone pathophysiology clearly identified a novel set of cytokines/cytokine receptors that are required for the control of bone remodeling [1–5]. These molecules named Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) and its receptors RANK and osteoprotegerin (OPG) appear as the final effectors of the most osteotropic factors already identified including thyroid hormones [21]. However, this mechanism appears more complex and Kanatani et al. evidenced that thyroid hormones stimulate osteoclast differentiation in part by a mechanism independent

of RANKL-RANK interaction [22]. In a cohort of patients suffering from benign and malignant tumors of thyroid gland, we showed that OPG, RANK and RANKL were not expressed by all specimens studied. RANK was similarly expressed by benign and malignant tumors, RANKL was essentially detected in medullary carcinomas and never in papillary carcinomas, and OPG was only restricted to rare cases. Furthermore, the immunohistochemistry analysis of lymph node metastases suggests a potential implication of OPG/RANK/RANKL triad in thyroid carcinogenesis and in the metastatic process of medullary carcinoma cells.

Then the present work revealed that the source of OPG and RANKL in 70% of thyroid carcinomas is not the thyroid gland

itself. Thus, the variations of OPG and RANKL levels observed during hyper- or hypothyroidism [8,9,23] could be the consequence of the dysregulation of OPG/RANKL balance in bone microenvironment due to the thyroid dysfunction associated or not with thyroid–pituitary axis perturbation [24,25]. However, these analyses of serum OPG and RANKL in patients suffering from thyroid diseases must be carefully interpreted. Indeed, it is well known that OPG levels increase with age [26] and reflect a protective mechanism of bone tissue [27] independently of any other metabolic disorders [28]. In fact, OPG and RANKL must be absolutely monitored together and in this context OPG/RANKL ratio may predict bone loss severity [13,29]. Similarly, in the present report, OPG was weakly expressed in all specimens studied but RANKL clearly appeared discriminating between PC and MC.

What could be the role of OPG/RANK/RANKL triad on thyroid carcinogenesis? Interestingly, the present data revealed a nuclear immunoreactivity especially for RANK which is known to act usually at the cell surface. The first evidence of nuclear RANK localization in osteosarcoma cells has been recently published [14]; however this finding is not unprecedented. Indeed, other membrane-associated growth factor receptors have been reported to function in the nucleus. This is the case of EGF [30] receptors and other TNF receptor family members including TRAIL receptors [31] and CD40 receptor [32]. The signalling proteins associated with the TNF family has also been observed in the nucleus (e.g., TRAFs, NF κ B, etc.) [33,34] suggesting the potential nuclear migration of signalling pathway components after the binding of TNF members to their membrane receptors. Wells and Marti have also suggested that this phenomenon might be involved in slowing or inhibiting proliferative signals that trigger in normal cells but may be ignored in cancer cells [35].

Recently, it has been suggested that RANKL has an important role in tumor cell migration *in vitro* and *in vivo* [36,37]. Jones et al. reported the expression of functional RANK on human epithelial cancer cells such as breast cancer (MDA-MB231, Hs578T, MCF7) and human prostate cancer (LNCaP, DU145) cell lines [36]. In these systems, RANKL triggered migration of RANK-expressing epithelial cancer cells, then demonstrating the functionality of membrane RANK on tumor cells [36,37]. Similarly, Mori et al demonstrated that RANKL modulates genes expression in osteosarcoma cell line including genes that were implicated in protein metabolism, nucleic acid metabolism, intracellular transport, cytoskeleton organization and biogenesis, apoptosis and signalling cascade [38]. A similar impact of RANK on the metabolism of carcinoma cells may be envisaged. Overall, these data strongly revealed the significant involvement of the OPG/RANK/RANKL system in metastatic cancer diseases [3–5] and blocking RANKL-RANK interaction has been envisaged to prevent the progression of cancer cells in bone [39]. Furthermore, a positive correlation has been reported between constant expressions of RANK with decreased/absent expression of RANKL and a high metastatic phenotype in breast carcinoma [40]. RANKL and OPG then appear as key effectors of epithelial cancer cells metastasizing to bone. Bone is the second most frequent site of metastasis resulting from thyroid carcinomas.

Incidence of bone metastasis is higher for papillary carcinomas compared to medullary carcinomas. Indeed, Do et al. evaluated the incidence of bone metastasis from follicular thyroid cancers around 6.8% and 0.4% from papillary carcinomas [41]. Therefore, in light of the present study and the literature, RANKL may be a good candidate associated with the bone metastasis potential of thyroid carcinomas. RANKL through its binding to RANK expressed on epithelial cells may affect their migration from thyroid to bone and through its binding to osteoclast/osteoclast precursors increases osteoclastic activity leading to bone remodelling alterations and then to the release of several growth factors stocked in the bone matrix. These factors may stimulate the vicious cycle that takes place between pathologic bone remodelling and tumor development in bone site. OPG/RANK/RANKL molecular triad may be also involved in the metastatic process of thyroid carcinoma cells to lymph node. Indeed, a strong expression of OPG has been evidenced in endothelial cells closely associated with tumor cells (Fig. 2). Whether OPG and RANKL stimulate monocyte chemotaxis through syndecan-1 [42] and RANK [43] respectively, OPG also upregulates endothelial cell adhesion which correlates with an enhanced binding of monocytes [44]. In this context, it could be hypothesized that OPG produced by endothelial of metastatic site such as lymph node acts as chemotaxis factor for thyroid carcinoma cells which strongly bind to endothelial cells over-expressing specific adhesion molecules. In this case, OPG-positive cells would be closely located to tumor cells in metastatic foci.

Our study shows that (i) RANK, RANKL and OPG are expressed in the neoplastic thyroid gland and not in normal thyroid parenchyma, (ii) in the main cases analyzed, thyroid tissues are not the principal source of RANKL and OPG, (iii) RANKL appears as a discriminating factor between papillary carcinomas and medullary carcinomas in contrast to RANK similarly expressed in both pathologies whereas OPG is mainly not expressed, (iv) OPG/RANK/RANKL appear involve in the metastatic process of carcinoma cells to lymph nodes. Thus OPG/RANK/RANKL molecular triad might play a role during of follicular parafollicular carcinogenesis especially in term of metastatic capacity. Further studies are needed to clarify the implication of these molecules into neoplastic thyroid glands.

Acknowledgements

We thank Dr Laurence Duplomb for her critical comments on this manuscript. This work was supported by a grant from the Région des Pays de la Loire, research program named CIMATH “Ciblage Moléculaire et Applications Thérapeutiques”.

References

- [1] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309–19.
- [2] Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, et al.

- Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165–76.
- [3] Théoleyre S, Wittrant Y, Kwan Tat S, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:457–75.
 - [4] Baud'huin M, Duplomb L, Ruiz Velasco C, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. Key roles of the OPG-RANK-RANKL system in bone oncology. *Expert Res Anticancer Rev* 2007;7:221–32.
 - [5] Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Rédini F, Heymann D. RANKL, RANK. Osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:2334–50.
 - [6] Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Ann Rev Immunol* 2006;24:33–63.
 - [7] Hofbauer LC, Kluger S, Kuhne CA, Dunstan CR, Burchert A, Schoppert M, Zeilke A, Heufelder AE. Detection and characterization of RANK ligand and osteoprotegerin in the thyroid gland. *J Cell Biochem* 2002;86:642–50.
 - [8] Amato G, Mazziotti G, Sorvillo F, Piscopo M, Lalli E, Biondi B, Iorio S, Molinari A, Giustina A, Carella C. High serum osteoprotegerin levels in patients with hyperthyroidism: effect of medical treatment. *Bone* 2004;35:785–91.
 - [9] Guang-da X, Hui-ling S, Zhi-song C, Lin-shuang Z. Alteration of plasma concentrations of OPG before and after levothyroxine replacement therapy in hypothyroid patients. *J Endocrinol Invest* 2005;28:965–72.
 - [10] Nagasaki T, Inaba M, Jono S, Hiura Y, Tahara H, Shirakawa K, Onoda N, Ishikawa T, Ishimura E, Nishizawa Y. Increased levels of serum osteoprotegerin in hypothyroid patients and its normalization with restoration of normal thyroid function. *Eur J Endocrinol* 2005;152:347–53.
 - [11] Mochizuki Y, Banda N, Hattori Y, Monden T. Correlation between serum osteoprotegerin and biomarkers of bone metabolism during anti-thyroid treatment in patients with Grave's disease. *Horm Res* 2006;66:236–9.
 - [12] Mikosch P, Igerc I, Kudlacek S, Woloszczuk W, Gallowitsch HJ, Kresnik E, Stettner H, Grimm G, Ling P, Pietschmann P. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin in men with thyroid cancer. *Eur J Clin Invest* 2006;36:566–73.
 - [13] Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, Gouin F, Redini F, Heymann D. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol* 2003;163:2021–31.
 - [14] Mori K, Le Goff B, Berreur M, Riet A, Moreau A, Blanchard F, Chevalier C, Guisle-Marsollier I, Leger J, Guicheux J, Masson M, Gouin F, Redini F, Heymann D. Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa. *J Pathol* 2007;211:555–62.
 - [15] Basset JH, O'Shea PJ, Sriskantharajah S, Rabier B, Boyde A, Howell PG, Weiss RE, Roux JP, Malaval L, Clement-Lacroix P, Samarut J, Chassande O, Williams GR. Thyroid hormone excess rather than thyrotropin deficiency induces osteoporosis in hyperthyroidism. *Mol Endocrinol* 2007;21:1095–107.
 - [16] Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, Ozasa A, Nakao K. A novel interaction between thyroid hormones and 1,25(OH)₂D(3) in osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:987–94.
 - [17] Kawaguchi H, Pilbeam CC, Woodiel FN, Rasiz LG. Comparison of the effects of 3,5,3'-triiodothyroacetic acid and triiodothyronine on bone resorption in cultured fetal rat long bones and neonatal mouse calvariae. *J Bone Miner Res* 1994;9:247–53.
 - [18] Rooman RP, Kuijpers G, Gresnigt R, Bloemen R, Koster JG, van Buul-Offers SC. Dexamethasone differentially inhibits thyroxine- or growth hormone-induced body and organ growth of snell dwarf mice. *Endocrinology* 2003;144:2553–8.
 - [19] Göthe S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Barros AC, Ohlsson C, Vennström B, Forrest D. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary–thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev* 1999;13:1329–41.
 - [20] Findlay DM, Sexton PM. Calcitonin. *Growth Factors* 2004;22:217–22.
 - [21] Varga F, Spitzer S, Klaushofer K. Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamine D3 (1,25D3) inversely regulate OPG gene expression in independence of the osteoblastic phenotype. *Calcif Tissue Int* 2004;74:382–7.
 - [22] Kanatani M, Sugimoto T, Sowa H, Kobayashi T, Kanzawa M, Chihara K. Thyroid hormone stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of RANKL-RANK interaction. *J Cell Physiol* 2004;201:17–25.
 - [23] Mazziotti G, Sorvillo F, Piscopo M, Cioffi M, Pilla P, Biondi B, Iorio S, Giustina A, Amato G, Carella C. Recombinant TSH modulates in vivo c-telopeptides of type-I collagen and bone alkaline phosphatase, but not osteoprotegerin production in postmenopausal women monitored for differentiated thyroid carcinoma. *J Bone Miner Res* 2005;20:480–6.
 - [24] Abe E, Mariani RC, Yu W, Wu XB, Ando T, Li Y, Iqbal J, Eldeiry L, Rajendran G, Blair HC, Davies TF, Zaidi M. TSH is a negative regulator of skeletal remodelling. *Cell* 2003;115:151–62.
 - [25] Sampath TK, Simic P, Sendak R, Draca N, Bowe AE, O'Brien S, Schiavi SC, PePherson JM, Vukicevic S. Thyroid stimulating hormone (TSH) restores bone volume microarchitecture and strength is aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2007;22:849–59.
 - [26] Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P, Willvonseder R. Austrian Study Group on Normative Values of Bone Metabolism. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2003;32:681–6.
 - [27] Ueland T, Brixen K, Mosekilde L, Flyvbjerg A, Bollersley J. Age-related changes in cortical bone content of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3, IGFBP-5, osteoprotegerin, and calcium in postmenopausal osteoporosis: a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1014–8.
 - [28] Giusti M, Cecoli F, Fazzuoli L, De Franchis V, Ceresola E, Ferone D, Mussap M, Minuto F. Serum osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand levels in patients with a history of differentiated thyroid carcinoma: a case-controlled cohort study. *Metabolism* 2007;56:699–707.
 - [29] Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meletis J, Viniou N, Yataganas X, Goldman JM, Rahemtulla A. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003;102:1064–9.
 - [30] Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:802–8.
 - [31] Zhang XD, Franco AV, Nguyen T, Gray CP, Hersey P. Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol* 2000;164:3961–70.
 - [32] Lin-Lee YC, Pham LV, Tamayo AT, Fu L, Zhou HJ, Yoshimura LC, Decker GL, Ford RJ. Nuclear localization in the biology of the CD40 receptor in normal and neoplastic human B lymphocytes. *J Biol Chem* 2006;281:18878–87.
 - [33] Min W, Bradley JR, Galbraith JJ, Jones SJ, Ledgerwood EC, Pober JS. The N-terminal domains target TNF receptor-associated factor-2 to the nucleus and display transcriptional regulatory activity. *J Immunol* 1998;161:319–24.
 - [34] Anest V, Hanson JL, Cogswell PC, Steinbrecher KA, Strahl BD, Baldwin AS. A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature* 2003;423:659–63.
 - [35] Wells A, Marti U. Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:697–702.
 - [36] Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, Morony S, Rubin E, Sarao R, Hojilla CV, Komnenovic V, Kong YY, Schreiber M, Dixon SJ, Sims SM, Khokha R, Wada T, Penninger JM. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006;440:692–6.
 - [37] Mori K, Le Goff B, Charrier C, Battaglia S, Heymann D, Rédini F. DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFkappaB: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. *Bone* 2007;40:981–90.
 - [38] Mori K, Berreur M, Blanchard F, Chevalier C, Guisle-Marsollier I, Masson M, Rédini F, Heymann D. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) directly modulates the gene expression profile of RANK-positive Saos-2 human osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 2007;18:1365–71.
 - [39] Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, Trichet V, Pitard B, Heymann D, Rédini F. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: prevention of bone resorption, inhibition of tumor progression, increase of animal survival. *Cancer Res* 2007;67:7308–18.
 - [40] Bhatia P, Sanders MM, Hansen MF. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:162–5.

- [41] Do MY, Rhee Y, Kim DJ, Kim CS, Nam KH, Ahn CW, Cha BS, Kim KR, Lee HC, Park CS, Lim SK. Clinical features of bone metastases resulting from thyroid cancer: a review of 28 patients over a 20-year period. *Endocrinol J* 2005;52:701–7.
- [42] Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani AM, Sturn DH, Patsch JR, Wiedermann CJ. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2964–71.
- [43] Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Sturn DH, Wiedermann CJ. Expression and function of RANK in human monocyte chemotaxis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2309–16.
- [44] Mangan SH, Campenhout AV, Rush C, Golledge J. Osteoprotegerin upregulates endothelial cell adhesion molecule response to tumor necrosis factor-alpha associated with induction of angiopoietin-2. *Cardiovasc Res* 2007;76:494–505.

Bibliographie

Bibliographie

Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification : mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ; 24 : 1161-1170.

Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 464-78.

Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, et al. Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol* 1993 ; 12 : 871-80.

Ait-Oufella H, Herbin O, Bouaziz JD, et al. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J Exp Med* 2010 ; 207 : 1579-1587.

Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 ; 31 : 969-979.

Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL : apoptosis signalling, biology and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003 ; 14 : 337-348.

Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1991 ; 11 : 1223-1230.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997 ; 390 (6656) : 175-179.

Ando K, Mori K, Redini F, Heymann D. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. *Curr Drug Discov Technol* 2008 ; 5 (3) : 263-268.

Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, Orekhov AN. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue Cell* 1998 Feb ; 30 (1) : 127-35.

Armstrong AP, Miller RE, Jones JC, Zhang J, Keller ET, Dougall WC. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate* 2008 ; 68 (1) : 92-104.

Atkinson JB, Harlan CW, Harlan GC, Virmani R. The association of mast cells and atherosclerosis: a morphologic study of early atherosclerotic lesions in young people. *Hum Pathol* 1994 ; 25 : 154-9.

Atlas d'Histologie humaine et animale (Thibaut R, Vincke G, Depiereux E, Raes M). <http://webapps.fundp.ac.be/umdb/histohuma/>

Auge N, Maupas-Schwalm F, Elbaz M, et al. Role for matrix metalloproteinase-2 in oxidized low-density lipoprotein-induced activation of the sphingomyelin/ceramide pathway and smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 2004 ; 110 : 571-8.

Balakrishnan KR, Kuruville S, Srinivasan A, Sehgal PK. Images in cardiovascular medicine. Electron microscopic insights into the vascular biology of atherosclerosis : study of coronary endarterectomy specimens. *Circulation* 2007 Apr 10 ; 115 (14) : e388-90.

Balica M, Boström K, Shin V, Tillisch K and Demer LL. Calcifying subpopulation of bovine aortic smooth muscle cells is responsive to 17 β -estradiol. *Circulation* 1997. 95 (7) : 1954-60.

Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 2007 Sep; 64 (18) : 2334-50.

Baud'huin M, Duplomb L, Téletchéa S, Charrier C, Maillason M, Fouassier M, Heymann D. Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival. *J Biol Chem* 2009 Nov 13 ; 284 (46) : 31704-13.

Baud'huin M, Renault R, Charrier C, Riet A, Moreau A, Brion R, Gouin F, Duplomb L, Heymann D. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Pathol* 2010 ; 221 : 77-86.

Bea F, Blessing E, Bennett B, Levitz M, Wallace EP and Rosenfeld ME. Simvastatin promotes atherosclerotic plaque stability in Apo E-deficient mice independently of lipid lowering. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2002 ; 22 (11) : 1832-1837.

Beleut M et al. Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2010 ; 107, 2989-2994.

Benslimane-Ahmim Z, Heymann D, Dizier B, Lokajczyk A, Brion R, Laurendeau I, Bièche I, Smadja DM, Galy-Fauroux I, Collic-Jouault S, Fischer AM, Boisson-Vidal C. Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *J Thromb Haemost* 2011 ; 9 : 834-43.

Ben-Tal Cohen E, Hohensinner PJ, Kaun C, Maurer G, Huber K, Wojta J. Statins decrease TNF-alpha-induced osteoprotegerin production by endothelial cells and smooth muscle cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 2007 ; 73 (1) : 77-83.

Bhatia VK, Yun S, Leung V, Grimsditch DC, Benson GM, Botto MB, Boyle JJ, Haskard DO. Complement C1q reduces early atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Am J Pathol* 2007 ; 170 : 416-426.

Biosse-Duplan M, Baroukh B, Dy M, de Vernejoul MC, Saffar JL. Histamine promotes osteoclastogenesis through the differential expression of histamine receptors on osteoclasts and osteoblasts. *Am J Pathol.* 2009 Apr ; 174 (4) : 1426-34.

Bobryshev YV. *Micron* 2006 ; 37 : 208-222.

Body JJ, Greipp P, Coleman RE, Facon T, Geurs F, Femand JP, Harousseau JL, Lipton A, Mariette X, Williams CD, Nakanishi A, Holloway D, Martin SW, Dunstan CR, Bekker PJ. A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* 2003 Feb 1 ; 97 (3 Suppl) : 887-92.

Boesiger J, Tsai M, Maurer M, et al. Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J Exp Med* 1998 ; 188 : 1135-45.

Borset M, Hjertner O, Yacoby S, Epstein J, et Sanderson RD. Syndecan-1 is targeted to the uropods of polarized myeloma cells where it promotes adhesion and sequesters heparin-binding proteins. *Blood* 2000 ; 96 (7) : 2528-2536.

Boström K, Watson KE, Hom S, Wortham C, Herman IM and Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993 ; 91 (4) : 1800-1809.

Boström K, Tsao D, Shen S et al. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 14044-52.

Bot I, van Berkel TJ and Biessen EA. Mast cells: pivotal players in cardiovascular diseases. *Curr Cardiol Rev* 2008 ; 4, 170-178.

Bovée JV, Hogendoorn PC, Wunder JS, Alman BA. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jul ; 10 (7) : 481-8.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003 ; 423 (6937) : 337-342.

Brandstrom H, Bjorkman T, Ljunggren O. Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ; 280 : 831-5.

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998 ; 12 : 1260-8.

Burton DG, Giles PJ, Sheerin AN et al. Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells : a link to atherosclerosis and vascular classification. *Exp Gerontol* 2009 ; 44 : 659-665.

Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 745–753.

Campus d'Anatomie Pathologique

<http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/umvf/anapath/corpus.htm>

Chantelau E, Lee KM, and Jungblut R. Distal arterial occlusive disease in diabetes is related to medial arterial calcification. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997 ; vol. 105 (supplement 2) : 11–13.

Civitelli, R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 2008 ; 473 (2) : 188-192.

Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med* 2006 ; 12 : 1075–1080.

Coen G, Ballanti P, Balducci A, et al. Renal osteodystrophy : alpha-Heremans Schmid glycoprotein/fetuin-A, matrix GLA protein serum levels, and bone histomorphometry. *Am J Kidney Dis*. 2006 ; 48 : 106–13.

Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, et Osdoby P. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2001 ; 276 (23) : 20659-20672.

Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 2004 ; 95 : 1046–57.

Corallini F, Celeghini C, Rimondi E, Di Lasio MG, Gonelli A, Secchiero P, Zauli G. Trail down-regulates the release of osteoprotegerin (OPG) by primary stromal cells. *J Cell Physiol* 2011 Sep ; 226 (9) : 2279-86.

Cross SS, Yang Z, Brown NJ, Balasubramaniam SP, Avans CA, Woodward JK. Osteoprotegerin (OPG) – a potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis? *Int J Cancer* 2006 ; 118 : 1901-8.

Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V, Stanley ER. Targeted disruption of the mouse colonystimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 2002 ; 99 : 111–120.

Dalager S, Paaske WP, Kristensen IB, Laurberg JM, Falk E. Artery-related differences in atherosclerosis expression : implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke* 2007 ; 38 : 2698-2705.

Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 2008 Jun 3 ; 117 (22) : 2938-48.

Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 ; 21 (12) : 1998-2003.

Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H, Rancel N, Valladares F. Microvascular pericytes : a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol* 1991 Apr ; 6 (2) : 269-86.

Doherty MJ, Canfield AE. Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999 ; 9 (1) : 1-17.

Doherty TM, Fitzpatrick LA, Inoue D, et al. Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. *Endocrine Reviews* 2004 ; 25 (4) : 629-672.

Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, et al. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 2004 ; 110 : 3424-9.

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, et Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998 ; 273 (23) : 14363-14367.

Engelse MA, Neele JM, Bronckers AL, Pannekoek H, and de Vries CJ. Vascular calcification: expression patterns of the osteoblast-specific gene core binding factor α -1 and the protective factor matrix Gla protein in human atherogenesis. *Cardiovascular Research* 2001 ; 52 (2) : 281–289.

Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res* 2004 ; 114 : 321–327.

Farhat GN, Cauley JA, Matthews KA, Newman AB, Johnston J, Mackey R, et al. Volumetric BMD and vascular calcification in middle-aged women : the Study of Women's Health Across the Nation. *J Bone Miner Res* 2006 Dec ; 21(12) : 1839-46.

Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Weissberg PL, et al. Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor. Biochem Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* 2003 ; 85-A : 59-66.

Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000 Sep 29 ; 103 (1) : 41-50.

Fawcett DW, Jensch RP. *Histologie – L'essentiel*. Editions Maloine 2002 ; p199-201.

Fernandez-Valdivia R et al. The RANKL signaling axis is sufficient to elicit ductal side-branching and alveologenesis in the mammary gland of the virgin mouse. *Dev. Biol* 2009 ; 328 : 127–139.

Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Thromb Vasc Biol* 2010 ; 30 : 1282-1292.

Fitzpatrick LA, Turner RT, and Ritman ER. Endochondral bone formation in the heart : a possible mechanism of coronary calcification. *Endocrinology* 2003 ; 144 (6) : 2214-2219.

Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006 ; 311 : 83- 87.

Foley RN, Parfrey PS, and Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 1998 ; 9 : S16-S23.

Forman MB, Oates JA, Robertson D, Robertson RM, Roberts LJ, Virmani R. Increased adventitial mast cells in a patient with coronary spasm. *N Engl J Med* 1985 ; 313: 1138-41.

Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* 2003 ; 85-A Suppl 3 : 59-66.

Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 1998 ; 188 : 997-1001.

Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells : recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005 ; 23 : 749-86.

Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, Meyer RI, Paul RJ, Lorenz JN, Fairchild-Huntress V, Dixon KL, Dunmore JH, Gimbrone MA Jr, Falb D, Huszar D. A role for Smad 6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet* 2000 ; 24 : 171-174.

Gao YH, Shinki T, Yuasa T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, Yamaguchi A. Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 252 : 697-702.

Gaut JP, Heinecke JW: Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein: insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2001 ; 11 : 103-112.

Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, et al. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *J Nutr* 2004 ; 134 : 3100-5.

Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. Proteases and bone remodelling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009 ; 20 (1) : 29-41.

Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003 Oct ; 314 (1) : 15-23.

Ghosh-Choudhury N, Choudhury GG, Harris MA, et al. Autoregulation of mouse BMP-2 gene transcription is directed by the proximal promoter element. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ; 286 : 101-8.

Giachelli CM, Speer MY, Li X, et al. Regulation of vascular calcification : roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* 2005 ; 96 : 717-22

Gleissner CA, Shaked I, Erbel C, Bockler D, Katus HA, Ley K. CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages. *Circ Res* 2010 ; 106 : 203-211.

Gonzalez-Suarez E et al. RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. *Mol Cell Biol* 2007 ; 27 : 1442-1454.

Gonzalez-Suarez E, Jacob AP, Jones J, Miller R, Roudier-Meyer MP, Erwert R, Pinkas J, Branstetter D, Dougall WC. RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* 2010 Nov 4 ; 468 (7320) : 103-7.

Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, et al. Coronary artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000 ; 342 (20) : 1478-1483.

Gruber BL, Marchese MJ, Suzuki K, et al. Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *J Clin Invest* 1989 ; 84 : 1657-62.

Gruber R. Cell biology of osteoimmunology. *Wien Med Wochenschr* 2010 ; 160 (17-18) : 438-45.

Hakozaki A, Yoda M, Tohmonda T, Furukawa M, Hikata T, Uchikawa S, Takaishi H, Matsumoto M, Chiba K, Horiuchi K, Toyama Y. *J Immunol* 2010 Mar 1 ; 184(5) : 2442-8.

Heikkilä HM, Lätti S, Leskinen MJ, Hakala JK, Kovanen PT, Lindstedt KA. Activated mast cells induce endothelial cell apoptosis by a combined action of chymase and tumor necrosis factoralpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 ; 28 : 309-14.

Helas S, Goettsch C, Schoppet M, Zeitz U, Hempel U, Morawietz H, Kostenuik PJ, Erben RG, Hofbauer LC. Inhibition of receptor activator of NF-kappaB ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. *Am J Pathol* 2009 ; 175 (2) : 473-478.

Heymann MF, Riet A, Le Goff B, Battaglia S, Paineau J, Heymann D. OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions. *Regul Pept* 2008 Jun 5 ; 148 (1-3) : 46-53.

Herisson F, Heymann MF, Chétiveaux M, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, Rouillon T, Krempf M, Lemarchand P, Heymann D, Goueffic Y. Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis* 2011 ; 216 : 348-354.

Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanaka S. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem* 2006 ; 281 (48) : 36846-36855.

Hill PA. Bone remodelling. *Br J Orthod* 1998 ; 25 (2) : 101-107.

Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 250 : 776-81.

Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999 ; 140 : 4382-9.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, et Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000 ; 15 (1) : 2-12.

Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001 ; 79 : 243-53.

Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*. 2004 ; 292 : 490-5.

Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002 ; 62 (6) : 1619-1623.

Holen I, Cross SS, Neville-Webbe HL, Cross NA, Balasubramanian SP, Croucher PI, Evans CA, Lippitt JM, Coleman RE, Eaton CL. Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo--a role in tumour cell survival? *Breast Cancer Res Treat* 2005 ; 92 (3) : 207-215.

Holen I, et Shipman CM. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006 ; 110 (3) : 279-291.

Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ Res* 2005 ; 97 : 105-14.

Hsu H, Lacey D, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 ; 96 (7) : 3540-3545.

Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, et al. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2004 May ; 113 (9) : 1258-65.

Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, Nissenson RA. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res* 2004 ; 19 : 235-44.

Huber SA, Sakkinen P, David C, Newell MK and Tracy RP. T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation* 2001 ; 103 : 2610-2616.

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001 ; 142 (4) : 1419-1426.

Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, et al. Calcification of the aortic arch: risk factors and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease. *JAMA* 2000 ; 283 : 2810-5.

Janzen J. The microscopic transitional zone between elastic and muscular arteries. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2004 ; 97 (9) : 909-14.

Jeziorska M, McCollum C, Woolley DE. Calcification in atherosclerotic plaque of human carotid arteries: associations with mast cells and macrophages. *J Pathol* 1998 ; 185 : 10-7.

Johnson JL, Jackson CL, Angelini GD, George SJ. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 ; 18 : 1707-15.

Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 2006 Nov 10 ; 99 (10) : 1044-59.

Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, Morony S, Rubin E, Sarao R, Hojilla CV, Komnenovic V, Kong YY, Schreiber M, Dixon SJ, Sims SM, Khokha R, Wada T, Penninger JM. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 2006 ;440 (7084) : 692-696.

Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 1998 ; 98 : 1302-1306.

Jono S, Otsuki S, Higashikuni Y, Shioi A, Mori K, Hara K, Hashimoto H, Ikari Y. Serum osteoprotegerin levels and long-term prognosis in subjects with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost* 2010 ; 8 : 1170-5.

Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT. Mast cells of two types differing in neutral protease composition in the human aortic intima. Demonstration of tryptase- and tryptase/chymase-containing mast cells in normal intimas, fatty streaks, and the shoulder region of atheromas. *Arterioscler Thromb* 1994 ; 14 : 966-72.

Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT. Extracellular mast cell granules carry apolipoprotein B-100-containing lipoproteins into phagocytes in human arterial intima. Functional coupling of exocytosis and phagocytosis in neighbouring cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 ; 15 : 2047-54.

Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT. Mast cells accompany microvessels in human coronary atheromas: implications for intimal neovascularization and hemorrhage. *Atherosclerosis* 1996 ; 123 : 123-31.

- Kaden JJ**, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoc A, Kilic R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, Borggreffe M. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 2004 ; 36 (1) : 57-66.
- Kadl A**, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, Elliott MR, Gruber F, Han J, Chen W, Kensler T, Ravichandran KS, Isakson BE, Wamhoff BR, Leitinger N. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* 2010 ; 107 : 737-746.
- Kamat BR**, Galli SJ, Barger AC, Lainey LL, Silverman KJ. Neovascularization and coronary atherosclerotic plaque: cinematographic localization and quantitative histologic analysis. *Hum Pathol* 1987 Oct ; 18(10) : 1036-42.
- Karsenty G**. The complexities of skeletal biology. *Nature* 2003 ; 423 : 316-318.
- Kartsogiannis V**, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, Niforas P, Ng KW, Martin TJ, Gillespie M.T. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999 ; 25 (5) : 525-534.
- Kastrati A**, Schömig A, Dietz R, Neumann FJ, Richardt G. Time course of restenosis during the first year after emergency coronary stenting. *Circulation* 1993 May ; 87 (5) : 1498-505.
- Kazama JJ**, Shigematsu T, Yano K, et al. Increased circulating levels of osteoclastogenesis inhibitory factor (osteoprotegerin) in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 2002 ; 39 : 525-32.
- Kees M**, Wiesbauer F, Gisslinger B, Wagner R, Shehata M, Gisslinger H. Elevated plasma osteoprotegerin levels are associated with venous thrombosis and bleeding in patients with polycythemia vera. *Thromb Haemost* 2005 ; 93 : 70-5.
- Ketteler M**, Wanner C, Metzger T, et al. Deficiencies of calcium-regulatory proteins in dialysis patients: a novel concept of cardiovascular calcification in uremia. *Kidney Int Suppl.* 2003 ; 84 : S84-7.
- Ketteler M**, Bongartz P, Westenfeld R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 2003 ; 361 : 827-33.
- Kim HH**, Shin HS, Kwak HJ, Ahn KY, Kim JH, Lee HJ, Lee MS, Lee ZH, Koh GY. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Faseb J* 2003 ; 17 (14) : 2163-2165.
- Kim NS**, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, Yokota Y, Penninger JM, Kong YY. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol* 2006 ; 26 (3) : 1002-1013.
- Kim YM**, Kim YM, Lee YM, Kim HS, Kim JD, Choi Y, Kim KW, Lee SY, Kwon YG. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation

of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2002 ; 277 (9) : 6799-6805.

Kindle L, Rothe L, Kriss M, Osdoby P, Collin-Osdoby P. Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2006 ; 21 (2) : 193-206.

King VL, Cassis LA, and Daugherty A. Interleukin-4 does not influence development of hypercholesterolemia or angiotensin II-induced atherosclerotic lesions in mice. *Am J Pathol* 2007 ; 171 : 2040-2047.

Kinoshita M, Okada M, Hara M, Furukawa Y, Matsumori A. Mast cell tryptase in mast cell granules enhances MCP-1 and interleukin-8 production in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ; 25 : 1858-63.

Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol Ther* 2010 ; 127 : 295-314.

Knudsen ST, Foss CH, Poulsen PL, et al. Increased plasma concentrations of osteoprotegerin in type 2 diabetic patients with microvascular complications. *Eur J Endocrinol* 2003 ; 149 : 39-42.

Kobayashi-Sakamoto M, Hirose K, Nishikata M, Isogai E, Chiba I. Osteoprotegerin protects endothelial cells against apoptotic cell death induced by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinases. *FEMS Microbiol Lett* 2006 ; 264 : 238-45.

Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K, Chiba I. Role of alpha(v) integrin in osteoprotegerin-induced endothelial cell migration and proliferation. *Microvasc Res* 2008 Nov; 76 (3) : 139-44.

Kolmakova A, Kwiterovich P, Virgil D, et al. Apolipoprotein C-I induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells via recruiting neutral sphingomyelinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ; 24 : 264-9.

Komarova Y, Malik AB. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu Rev Physiol* 2010 ; 72 : 463-493.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999 ; 397 (6717) : 315-323.

Koos R, Mahnken AH, Muhlenbruch G, et al. Relation of oral anticoagulation to cardiac valvular and coronary calcium assessed by multislice spiral computed tomography. *Am J Cardiol* 2005 ; 96 : 747-9.

Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol* 2006 ; 315 : 13-34.

Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, and Freeman MW. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 49982-49988.

Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004 ; 15 (1) : 49-60.

Kyaw T, Tay C, Khan A, et al. Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis. *J Immunol* 2010 ; 185 : 4410-4419.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998 ; 93 (2) : 165-176.

Lal BK, Hobson RW 2nd, Goldstein J, Geohagan M, Chakhtoura E, Pappas PJ, Jamil Z, Haser PB, Varma S, Padberg FT, Cerveira JJ. In-stent recurrent stenosis after carotid artery stenting: life table analysis and clinical relevance. *J Vasc Surg* 2003 Dec ; 38 (6) : 1162-8.

Lammer J, Bosiers M, Zeller T, Schillinger M, Boone E, Zaugg MJ, Verta P, Peng L, Gao X, Schwartz LB. First clinical trial of nitinol self-expanding everolimus-eluting stent implantation for peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Surg* 2011 ; 54 : 394-401.

Lamoureux F, Baud'huin M, Duplomb L, Heymann D, Redini F. Proteoglycans : key partners in bone cell biology. *Bioessays* 2007 ; 29 (8) : 758-771.

Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, Trichet V, Blanchard F, Gouin F, Pitard B, Heymann D, Redini F. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res* 2007b ; 67 (15) : 7308-7318.

Lamoureux F, Picarda G, Garrigue-Antar L, Baud'huin M, Trichet V, Vidal A, Miot-Noirault E, Pitard B, Heymann D, Redini F. Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. *Cancer Res* 2009 ; 69 (2) : 526-536.

Lappalainen H, Laine P, Pentikäinen MO, Sajantila A, Kovanen PT. Mast cells in neovascularized human coronary plaques store and secrete basic fibroblast growth factor, a potent angiogenic mediator. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ; 24 : 1880-85.

Lebreton JP, Joisel F, Raoult JP, et al. Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *J Clin Invest* 1979 ; 64 : 1118-29.

Lee FY, Lee TS, Pan CC, Huang AL, Chau LY: Colocalization of iron and ceroid in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1998 ; 138 : 281-288.

Lee M, Calabresi L, Chiesa G, Franceschini G, Kovanen PT. Mast cell chymase degrades apoE and apoA-II in apoA-I-knockout mouse plasma and reduces its ability to promote cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 ; 22 : 1475-81.

Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 1999 ; 140 : 3552-61.

Lees M, Taylor DJ, Woolley DE. Mast cell proteinases activate precursor of collagenase and stromelysin but not of gelatinases A and B. *Eur J Biochem* 1994 ; 223 : 171-77.

Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 Aug ; 16 (8) : 978-83.

Leroux-Berger M, Queguiner I, Maciel TT, Ho A, Relaix F, Krempf H. Pathological calcification of adult vascular smooth muscle cells differs upon their crest or mesodermal embryonic origin. 2011 Jul ; 26 (7) : 1543-53.

Leskinen MJ, Heikkila HM, Speer MY, et al. Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by disrupting NF-kappaB-mediated survival signaling. *Exp Cell Res* 2006 ; 312 : 1289-98.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007 ; 7 : 678-689.

Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Thromb Vasc Biol* 2011 ; 31 : 1506-1516.

Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 ; 97 (4) : 1566-1571.

Li W, Xu LH, Forssell C, Sullivan JL, Yuan XM. Over-expression of transferrin receptor and ferritin related to clinical symptoms and destabilization of human carotid plaques. *Exp Biol Med* 2008 Jul ; 233 (7) : 818-26.

Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, *et al.* Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 2008 ; 320: 807-811.

Lindstedt KA, Kokkonen JO, Kovanen PT. Inhibition of copper-mediated oxidation of LDL by rat serosal mast cells. A novel cellular protective mechanism involving proteolysis of the substrate under oxidative stress. *Arterioscler Thromb* 1993 ; 13 : 23-32.

Lindstedt KA. Inhibition of macrophage-mediated low density lipoprotein oxidation by stimulated rat serosal mast cells. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 7741-6.

Liu J, Thewke DP, Su YR, Linton MF, Fazio S, Sinensky MS. Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ; 25 : 174-179.

Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlöndorff J, Tempst P, Choi Y, Blobel CP. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 1999 May 7 ; 274 (19) : 13613-8.

Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997 ; 386 : 78-81.

Macé B. Histologie – Bases fondamentales. Omniscience 2008 ; p 206-212.

Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 ; 27 (6) : 1248-58.

Major AS, Fazio S, Linton MF. B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 ; 22 : 1892-1898.

Makjanic J, Ponraj D, Tan BKH, Watt F: Nuclear microscopy investigations into the role of iron in atherosclerosis. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 1999 ; 158 : 356-360.

Mallat Z, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res* 2001 ; 88 : 998-1003.

Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, and Tedgui A. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J. Lipid Res* 2009 ; 50 : S364–S369.

Mallick NP and Berlyne GM. Arterial calcification after vitamin-D therapy in hyperphosphatemic renal failure. *The Lancet* 1968 ; 292 (7582) : 1316-1320.

Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an alpha_vbeta₃-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 20959-62.

Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 ; 29 : 1419-1423.

Marie PJ. The calcium sensing receptor in bone cells: A potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* 2010 Mar ; 46 (3) : 571-6.

Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages : an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009 ; 27 : 451-483.

Mathew S, Davies M, Lund R, et al. Function and effect of bone morphogenetic protein-7 in kidney bone and the bone-vascular links in chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest* 2006 ; 36 : 43-50.

Mikami S, Katsube K, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, Mochizuki S, Ikeda T, Mukai M, Okada Y. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. *J Pathol* 2009 ; 218 (4) : 530-539.

Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, Baker AH, McInnes IB, Liew FY. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* 2008 ; 205 : 339-346.

Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2000 ; 192 : 463-74.

Minqin R, Watt F, Huat BT, Halliwell B: Correlation of iron and zinc levels with lesion newly depth in formed atherosclerotic lesions. *Free Radic Biol Med* 2003 ; 34 : 746-752.

Moe SM, O'Neil KD, Duan D, et al. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney International* 2002 ; 61 (2) : 638-647.

Moe SM, Reslerova M, Ketteler M, et al. Role of calcification inhibitors in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int* 2005 ; 67 : 2295-304.

Mönckeberg JG. Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Archiv* 1903 ; 171 (1) : 141-167.

Montecucco F, S Steffens S, Mach F. The Immune Response Is Involved in Atherosclerotic Plaque Calcification: could the RANKL/RANK/OPG system be a marker of plaque instability? *Clin Dev Immunol* 2007 ; 2007 : 75805.

Mori K, Le Goff B, Charrier C, Battaglia S, Heymann D, Redini F. DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFkappaB: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. *Bone* 2007 ; 40 (4) : 981-990.

Mori K, Ando K, Heymann D, Redini F. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) stimulates bone-associated tumors through functional RANK expressed on bone-associated cancer cells? *Histol Histopathol* 2009 ; 24 (2) : 235-242.

Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnàr F, Falotico R. RAVEL Study Group. Randomized Study with the Sirolimus-Coated Bx Velocity Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with de Novo Native Coronary Artery Lesions. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Eng J Med* 2002 Jun 6 ; 346 (23) : 1773-80.

Morony S, Warmington K, Adamu S, Asuncion F, Geng Z, Grisanti M, Tan HL, Capparelli C, Starnes C, Weimann B, Dunstan CR, Kostenuik PJ. The inhibition of RANKL causes greater suppression of bone resorption and hypercalcemia compared with bisphosphonates in two models of humoral hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology* 2005 Aug ; 146 (8) : 3235-43.

Morrison L and Bogan IK. Calcification of the vessels in diabetes. *Journal of the American Medical Association* 1929 ; 92 : 1424-1426.

Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani AM, Sturn DH, Patsch, JR, et Wiedermann CJ. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 ; 90 (5) : 2964-2971.

Mukai S, Kitazawa R, Ishii J, Kondo T, Hakozaiki A, Horiuchi K, Haraguch R, Mori K, Kitazawa S. Identification and analysis of function of a novel splicing variant of mouse receptor activator of NF- κ B. *Mol Cell Biochem* 2011 Apr ; 350 (1-2) : 29-38.

Mukhopadhyay S, Pluddemann A, Gordon S. Macrophage pattern recognition receptors in immunity, homeostasis and self tolerance. *Adv Exp Med Biol* 2009 ; 653 : 1-14.

Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP et al. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* 1999 ; 21 : 142-4.

Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 253 (2) : 395-400.

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 275 : 768-75.

Norman PE, Powell JT. Vitamin D shedding light on the development of disease in peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ; 25 (1) : 39-46.

Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. Identification of clonogenic common Flt3M-CSFR plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 1207-1216.

Ozoren N and El-Deiry WS. Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2003 ; 13 : 135-147.

Paananen K, Kovanen PT. Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles independently strengthen their binding to exocytosed mast cell granules. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 2023-31.

Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology* 1998 ; 139 (6) : 2659-2661.

Pallon J, Homman P, Pinheiro T, Halpern MJ, Malmqvist K. A view on elemental distribution alterations of coronary artery walls in atherogenesis. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 1995 ; 104 : 344-350.

Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of

NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol* 2002 ; 169 : 3353-62.

Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997 ; 276 : 111-113.

Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitingner N, Watson AD, Tintut Y, et al. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Apr ; 17 (4) : 680-7.

Parhami F, Basseri B, Hwang J, Tintut Y, Demer LL. High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells. *Circ Res* 2002 Oct 4 ; 91 (7) : 570-6.

Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, Lengauer C. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 2005 ; 11 : 261-2.

Pettersen I, Bakkelund W, Smedsrod B, Sveinbjornsson B. Osteoprotegerin is expressed in colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 2005 ; 25 (6B) : 3809-3816.

Poirier J, Coujard R, Rocardot J, Leblond CP. Précis d'histologie humaine. Masson Presses de l'Université Laval (p177-179)

Poole KE, Reeve J. Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent. *Curr Opin Pharmacol* 2005 ; 5 (6) : 612-617.

Price PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 1983 ; 117 : 765-71.

Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 ; 18 : 1400-7.

Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 May ; 21 (5) : 817-24.

Price PA, June HH, Buckley JR, et Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 ; 21 (10) : 1610-1616.

Price PA, Thomas GR, Pardini AW, et al. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 3926-34.

Price PA, Lim JE. The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin mineral complex. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 22144-52.

Pritzker LB, Scatena M, et Giachelli CM. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Mol Biol Cell* 2004 ; 15 (6) : 2834-2841.

Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, and Weissberg PL. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1998 ; 18 (3) : 379-388.

Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro : evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000 Nov 24 ; 87 (11) : 1055-62.

Proudfoot D and Shanahan CM. Biology of calcification in vascular cells : intima versus media. *Herz* 2001 ; 26 (4) : 245-251.

Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, et al. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis : studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol* 1997 ; 150 (5) : 1687-1699.

Qiao JH, Mertens RB, Fishbein MC, and Geller SA. Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: morphologic evidence of enchondral ossification. *Hum Pathol* 2003 ; 34 (4) : 402-407.

Qin L, Raggatt LJ, Partridge NC. Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2004 ; 15 (2) : 60-65.

Radcliff K, Tang TB, Lim J, Zhang Z, Abedin M, Demer LL, et al. Insulin-like growth factor-I regulates proliferation and osteoblastic differentiation of calcifying vascular cells via extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circ Res* 2005 Mar 4 ; 96 (4) : 398-400.

Raggatt LJ and Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 2010 ; 285 (33) : 25103-8.

Reid P, Holen I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *Eur J Cell Biol* 2009 ; 88 (1) : 1-17.

Rennenberg RJ, Schurgers LJ, Kroon AA, Stehouwer CD. *J Cell Mol Med* 2010 Sep ; 14(9) : 2203-10.

Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem* 2003 ; 88 : 650-9.

Robbins S, Kumar V, Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia, PA. Saunders/Elsevier 8th Edition ; 2010.

Roijers RB, Debernardi N, Cleutjens JP, Schurgers LJ, Mutsaers PH, van der Vusse GJ. Microcalcifications in early intimal lesions of atherosclerotic human coronary arteries. *Am J Pathol* June 2011 ; 178 (6).

Ross R. Atherosclerosis – A inflammatory disease. The new England Journal of Medicine 1999 ; 340 (2) : 115-126.

Rousselle AV, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. Bone 2002 Apr ; 30 (4) : 533-40.

Sabouret P, Cacoub P, Dallongeville J, Krempf M, Mas JL, Pinel JF, Piollet P, Steg G, Taminau D, Montalescot G ; REACH Registry investigators. REACH : international prospective observational registry in patients at risk of atherothrombotic events. Results for the French arm at baseline and one year. Arch Cardiovasc Dis 2008 ; 101 (2) : 81-8.

Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. Endocrinology 2001 ; 142 : 2205-12.

Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, et al. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. Calcif Tissue Int 2004 ; 74 : 103-6.

Scatena M, Giachelli C. The alpha(v)beta3 integrin, NF-kappaB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis. Trends Cardiovasc Med 2002 ; 12 (2) : 83-88.

Schafer C, Heiss A, Schwarz A, et al. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. J Clin Invest 2003 ; 112 : 357-66.

Schillinger M, Sabeti S, Loewe C, Dick P, Amighi J, Mlekusch W, Schlager O, Cejna M, Lammer J, Minar E. Balloon angioplasty versus implantation of nitinol stents in the superficial femoral artery. N Eng J Med 2006 May 4 ; 354 (18) : 1879-88.

Schillinger M, Sabeti S, Dick P, Amighi J, Mlekusch W, Schlager O, Loewe C, Cejna M, Lammer J, Minar E. Sustained benefit at 2 years of primary femoropopliteal stenting compared with balloon angioplasty with optional stenting. Circulation. 2007 May 29 ; 115 (21) : 2745-9.

Schneeweis LA, Willard D, et Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. J Biol Chem 2005 ; 280 (50) : 41155-41164.

Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin : paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002 ; 22 : 549-53.

Schoppet M, Henser S, Ruppert V, Stubig T, Al-Fakhri N, Maisch B, et Hofbauer LC. Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF-kappaB-dependent. J Cell Biochem 2007 ; 100 (6) : 1430-1439.

Schoppet M, Kavurma MM, , Hofbauer LC, et al. Crystallizing nanoparticles derived from vascular smooth muscle cells contain the calcification inhibitor osteoprotegerin. Biochem Biophys Res Commun 2011 ; 407 (1) : 103-7.

Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, Kenner L, Pospisilik JA, Lee HJ, Hanada R, Joshi PA, Aliprantis A, Glimcher L, Pasparakis M, Khokha R, Ormandy CJ, Widschwendter M, Schett G, Penninger JM. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. *Nature* 2010 Nov 4 ; 468 (7320) : 98-102.

Schramek D, Sigl V, Penninger JM. RANKL and RANK in sex hormone-induced breast cancer and breast cancer metastasis. *Trends Endocrinol Metab* 2011 May ; 22 (5) : 188-94.

Schurgers LJ, Aebert H, Vermeer C, et al. Oral anticoagulant treatment : friend or foe in cardiovascular disease? *Blood* 2004 ; 104 : 3231-2.

Secchiero P, Corallini F, Beltrami AP, Ceconi C, Bonasia V, Di Chiara A, Ferrari R, Zauli G. An imbalanced OPG/TRAIL ratio is associated to severe acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2010 ; 210 : 274-7.

Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 2005 May ; 115 (5) : 1210-20.

Shao JS, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification : lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 ; 26 : 1423-30.

Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *Faseb J* 1993 Aug ; 7 (11) :1031-8.

Shimizu K, Shichiri M, Libby P, Lee RT, Mitchell RN. Th2-predominant inflammation and blockade of IFN- γ signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J Clin Invest* 2004 ; 114 : 300-308.

Shioi A, Katagi M, Okuno Y, et al. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smoothmuscle cells : roles of tumor necrosis factor- α and oncostatin M derived from macrophages. *Circulation Research* 2002 ; 91 (1) : 9-16.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997 ; 89 (2) : 309-319.

Sims DE. Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. *Can J Cardiol*. 1991 Dec ; 7 (10) : 431-43.

Six I, Massy ZA. Inflammation and vascular calcifications. *Nephrol Ther* 2010 Feb ; 6 Suppl (1) : S13-8.

Speer MY, McKee MD, Guldborg RE, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med* 2002 ; 196 : 1047-55.

Srivastava S, Matsuda M, Hou Z, Bailey JP, Kitazawa R, Herbst MP, Horseman ND. Receptor activator of NF-kappaB ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 2003 ; 278 (46) : 46171-46178.

Stadler N, Lindner RA, Davies MJ: Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ; 24 : 949-954.

Standal T, Seidel C, Hjertner Ø, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, Borset M, Sundan A. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 2002 Oct 15 ; 100 (8) : 3002-7.

Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, et al. Biology and action of colony-stimulating factor-1. *Mol Reprod Dev* 1997 ; 46 (1) : 4-10.

Stary HC. Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression. *Zeitschrift für Kardiologie* 2000 ; 89 (supp 2) : 28-35.

Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, et al. Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int* 2005 ; 67 : 2383-92.

Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004 ; 84 : 1381-1478.

Stoneman VE, Bennett MR. Role of Fas/Fas-L in vascular cell apoptosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009 ; 53 : 100-108.

Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* . 1992 ; 13 (1) : 66-80.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999. 20 : 345-57.

Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, Seki S, Kasai M, Utsuyama M, Tatsumi M, Uematsu H, et Hirokawa K. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 314 (4) : 1021-1027.

Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis : the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ; 25 : 2255-2264.

Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* 2010 ; 10 : 36-46.

Takeda K, Smyth M J, Cretney E et al. Critical role for tumour necrosis factor-related apoptosis inducing ligand in immune surveillance against tumour development. *J Exp Med* 2002 ; 195 : 161-169.

Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. Adaptive T cell immune responses and atherogenesis. *Curr Opin Pharmacol* 2010 ; 10 : 197-202.

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

Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004 Dec ; 15 (6) : 457-75.

Theoleyre S, Kwan Tat S, Vusio P, Blanchard F, Gallagher J, Ricard-Blum S, Fortun Y, Padrines M, Redini F, et Heymann D. Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance : role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 ; 347 (2) : 460-467.

Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 36241-50.

Tilton RG. Capillary pericytes: perspectives and future trends. *J Electron Microsc Tech* 1991 Nov ; 19 (3) : 327-44.

Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 2000 Nov 21 ; 102 (21) : 2636-42.

Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Bostrom K, et al. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 2003 Nov 18 ; 108 (20) : 2505-10.

Towler DA, Clemens TL. Vitamin D and cardiovascular medicine. In : Feldman D, Pike JW, Glorieux FH, editors. *Vitamin D*, 2nd edition. Amsterdam : Elsevier Academic Press ; 2005. pp 899-910.

Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress : the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* 1998 ; 3 (6) : 346-355.

Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification : an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004 ; 286 : E686-696.

Vengrenyuk Y, Carlier S, Xanthos S, et al. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 14678-83.

Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 2006 ; 47 : C13-8.

Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli M. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures : inhibition by osteopontin. *Circulation research* 1999 ; 84 (2) : 166-178.

Wang AY, Woo J, Lam CW, et al. Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005 ; 20 : 1676-85.

Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 1994 May ; 93 (5) : 2106-13.

Weber C, Zerneck A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* 2008 ; 8 : 802-815.

Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante Jr AW, et al., Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 (12) : 4828-4832.

Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante Jr AW, et al. Correction: total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 (13) : 5937-5941.

Wiktor-Jedrzejczak W, Gordon S. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev* 1996 ; 76 : 927-947.

Wittrant Y, Couillaud S, Théoleyre S, Dunstan C, Heymann D, Redini F. Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; 293 : 38-44.

Wittrant Y, Théoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, Rédini F. RANKL/RANK/OPG : new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 2004 sep 20 ; 17 (2) : 49-57.

Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS 3rd, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997 ; 272 (40) : 25190-25194.

Wong BR, Josien R, Lee SY, Vologodskaja M, Steinman RM, Choi Y. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 28355-9.

Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaja M, Hanafusa H, Choi Y. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* 1999 ; 4 : 1041-9.

Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM. Osteoclast apoptosis : the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology* 2003 ; 144 (12) : 5545-5555.

Yamaguchi K, Kinoshita M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, et Higashio K. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem* 1998 ; 273 (9) : 5117-5123.

Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000 Nov 2 ; 408 (6808) : 92-6.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG) : a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998 ; 139 (3) : 1329-1337.

Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, Pascual V, Hood LE, Clark EA. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol* 1998 ; 161 (11) : 6113-6121.

Zannettino AC, Holding CA, Diamond P, Atkins GJ, Kostakis P, Farrugia A, Gamble J, To LB, Findlay DM, et Haynes DR. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J Cell Physiol* 2005 ; 204 (2) : 714-723.

Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 4388-94.

Zebboudj AF, Shin V, Bostrom K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem* 2003 ; 90 : 756-65.

Zhang XD, Nguyen T, Thomas WD, Sanders JE and Hersey P. Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett* 2000 ; 482 : 193-199.

Zhang J, Alcaide P, Liu L, Sun J, He A, et al. (2011) Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PLoS ONE* 2011 ; 6 (1) : e14525.

Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Vitamin D and vascular calcification. *Curr Opin Lipidol* 2007 ; 18 : 41-46.

RESUME et MOTS CLES

Implication de la triade OPG/RANK/RANKL en physiopathologie vasculaire : à propos d'une étude comparée entre plaques athéromateuses carotidiennes et fémorales.

La triade moléculaire Osteoprotegerin (OPG)/Receptor Activator of NFκB (RANK)/RANK Ligand (RANKL) exerce plus spécifiquement son activité sur les systèmes ostéoarticulaire, immunitaire et vasculaire. Ce travail a permis l'étude de son implication dans la genèse de la plaque athéromateuse, en comparant deux sites d'artériopathie périphérique : carotide et fémorale. Actuellement, les résultats du traitement endovasculaire sont limités par la survenue de resténose et diffère selon le territoire artériel. A partir d'une biocollection de pièces d'endarterectomie, une analyse histologique comparative a été réalisée : les plaques carotidiennes sont fibrolipidiques avec un abondant infiltrat macrophagique alors que les fémorales sont plus calcifiées avec souvent métaplasie ostéoïde. En immunohistochimie, les plaques carotidiennes expriment plus fréquemment l'OPG par rapport aux fémorales, cette expression étant corrélée avec l'infiltrat macrophagique. L'expression de RANK et RANKL est équivalente dans les deux lits artériels. L'OPG semble donc jouer un rôle dans la différence de calcification des plaques carotidiennes et fémorales. L'analyse des acteurs cellulaires tels les macrophages, les cellules musculaires lisses et péricytes, éléments clés du processus, permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mots clés : athérome, artère carotide, artère fémorale, calcification, OPG, RANK, RANKL

Implication of the OPG/RANK/RANKL triad in vascular physiopathology : comparison between carotid and femoral atheromatous plaques.

The molecular triad osteoprotegerin (OPG)/Receptor Activator of NFκB (RANK)/RANK Ligand (RANKL) exerts its activity on the osteoarticular, immunologic and vascular systems. The present work demonstrates its implication in the atheromatous plaque genesis, comparing two beds of peripheral arterial disease: carotid and femoral. Currently, the results of endovascular treatment are limited by stenosis and differ according to the arterial territory. A comparative histologic study has been carried out from a biocollection of endarteriectomies : carotid plaques are fibrolipidic with abundant macrophagic population whereas femoral plaques reveal more calcifications associated with osteoid metaplasia. Carotid plaques exhibit more frequently OPG compared to femoral arteries as shown by immunohistochemistry, correlating with the macrophagic population. RANK and RANKL are similarly expressed in the two arterial beds. OPG appears to play a role in the differential calcification process of carotid and femoral plaques. The study of cellular actors like macrophages, vascular smooth muscle cells and pericytes will allow to identify novel therapeutic targets.

Kev words : atheroma, carotid arterv, femoral artery, calcification, OPG, RANK, RANKL