

UNIVERSITÉ DE NANTES

UFR MEDECINE

N° attribué par la bibliothèque

Année 2014

N° 20

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

**Calcifications Artérielles : implication de la métaplasie
ostéoïde et de l'ostéoprotégérine dans la stabilité des plaques
athéromateuses carotidiennes et rôle de l'ostéoprotégérine
et des péricytes dans la formation des calcifications
artérielles carotidiennes et fémorales**

THÈSE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale BIOLOGIE-SANTE

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée

et soutenue publiquement par

Jean-Michel DAVAINÉ

Le 30 Octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

Pr Jean-Baptiste Michel, Directeur de Recherche DRCE Inserm, UMRS 1148- LVTS, GH Bichat-Claude Bernard, Paris

Dr Catherine Boisson-Vidal, Directrice de Recherche DR2 CNRS, UMR-S1140, Paris

Examineurs :

Pr Dominique Heymann, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, UMR 957, LPRO, Faculté de Médecine de Nantes.

Pr David Magne, Professeur, ICBMS UMR CNRS 5246 Lyon

Dr Antoine Millon, Praticien Hospitalier-Universitaire, CHU de Lyon

Directeur de thèse :

Dr Marie-Françoise Heymann, Maître de conférences des universités- Praticien Hospitalier, CHU de Nantes

Co- directeur :

Pr Yann Gouëffic, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, CHU de Nantes

Calcifications Artérielles : implication de la métaplasie ostéoïde et de l'ostéoprotégérine dans la stabilité des plaques athéromateuses carotidiennes et rôle de l'ostéoprotégérine et des péricytes dans la formation des calcifications artérielles carotidiennes et fémorales

Résumé

Les calcifications artérielles sont fréquentes et leur prévalence augmente avec l'âge, le diabète et l'insuffisance rénale chronique. Leur impact clinique sur la stabilité des plaques est considérable. Leur formation fait suite à un processus hautement régulé, présentant de nombreuses similitudes avec la formation osseuse. A partir d'une biocollection de patients nous avons étudié la composante calcique des plaques au niveau carotidien et fémoral. Nous avons identifié la présence d'un type particulier de calcification, appelée métaplasie ostéoïde (MO), qui présente tous les éléments caractéristiques du tissu osseux. Au niveau carotidien, la MO était associée au caractère asymptomatique et à la stabilité des plaques. La présence d'ostéoprotégérine (OPG), protéine fondamentale du métabolisme osseux, était significativement associée dans la plaque et dans le plasma au caractère asymptomatique et à la stabilité des plaques. Nos résultats suggèrent que les péricytes sont fortement impliqués dans la formation de la métaplasie ostéoïde, en partie à travers leur sécrétion d'OPG. Les résultats au niveau fémoral retrouvaient également une forte proportion de MO et confirmaient l'implication des péricytes et de l'OPG dans la formation et la régulation des calcifications artérielles.

Enfin, on notait *in vitro* un effet chémo-attractant des péricytes sur les macrophages et une influence en faveur d'une différenciation phénotypique de type M2.

Ce travail décrit la formation des calcifications artérielles au niveau carotidien et fémoral et montrent un rôle de la MO sur la stabilité de la plaque, et étudie le rôle régulateur des péricytes et de l'OPG dans ce processus.

Mots clés

Calcifications artérielles, Ostéoprotégérine, Péricytes, Stabilité de la plaque, Artériopathie périphérique, Athérosclérose, Accident vasculaire cérébral

Arterial calcifications : implication of osteoid metaplasia and osteoprotegerin in atheromatous carotid plaque stability and role of osteoprotegerin and of pericyte cells in the onset of carotid and femoral arterial calcification

Abstract

Arterial calcification (AC) are frequent and their prevalence increase with aging, diabetes and renal insufficiency. They have a dramatic clinical impact. AC develop following a highly-regulated process reminiscent of bone formation. Based on a biocollection of patients, we studied the calcic content of carotid and femoral lesions. We observed that the presence of bone-like vascular calcification, namely osteoid metaplasia (OM), was significantly associated with the asymptomatic nature and the stability of carotid plaques. The presence of osteoprotegerin (OPG), which is instrumental in bone tissue metabolism, was significantly associated with asymptomatic/ stable plaques. At the cellular level, our results support that pericytes cell are critical in the formation of OM, at least in part through their OPG secretion. Analysis of femoral lesions showed a high proportion of OM in these plaques and further suggested a critical role of OPG and pericytes in the onset and the regulation of OM. Finally, we noted that, *in vitro*, pericytes had chemoattractant properties towards monocytes and favored an M2 phenotypic differentiation of monocytes.

This work provides original and detailed description of arterial calcification at the carotid and femoral levels. Our results shed light on the role of OM on plaque stability and further support a critical role of pericytes and OG in OM formation.

Key words

Arterial calcification, Osteoprotegerin, Pericyte cells, Plaque stability, Peripheral arterial disease, Atherosclerosis, Stroke

Table des matières

PREAMBULE ET OBJECTIFS DE LA THESE	4
REMERCIEMENTS	7
ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION.....	10
RAPPELS SUR LA PAROI ARTÉRIELLE.....	10
<i>La paroi artérielle comporte schématiquement 3 tuniques concentriques:.....</i>	10
<i>Les artères se terminent de 2 manières</i>	10
<i>La vascularisation de la paroi des artères est particulière:.....</i>	10
<i>On distingue 3 différents types d'artères en fonction de leur calibre et de leur structure:.....</i>	11
ATHÉROSCLÉROSE.....	12
<i>Anatomopathologie de l'athérosclérose humaine</i>	13
<i>Physiopathologie.....</i>	16
<i>Aspects cliniques des complications des plaques athéroscléreuses</i>	19
CONCEPT D'HÉTÉROGÉNÉITÉ ARTÉRIELLE ET PROJET ECLA.....	20
CALCIFICATIONS ARTÉRIELLES	23
<i>Différentes catégories de calcifications artérielles</i>	23
<i>Les calcifications artérielles reproduisent l'ossification physiologique</i>	25
<i>Principaux mécanismes de régulation des calcifications artérielles.....</i>	28
<i>Implications cliniques des calcifications artérielles et perspectives thérapeutiques.....</i>	35
TRIADÉ OPG-RANK-RANKL ET CALCIFICATIONS ARTÉRIELLES	36
<i>OPG.....</i>	36
<i>RANKL</i>	41
<i>RANK.....</i>	44
<i>Implication de la triade OPG/RANK/RANKL en pathologie vasculaire.....</i>	47
PÉRICYTES: RAPPELS ET IMPLICATIONS POTENTIELLES DES PÉRICYTES DANS LA FORMATION ET LA RÉGULATION DES CALCIFICATIONS ARTÉRIELLES	50
<i>Rappels sur les péricytes</i>	50
<i>Implication potentielle des péricytes dans les calcifications artérielles</i>	52
MATERIELS ET METHODES.....	56
CULTURE CELLULAIRE.....	56
MILIEUX CONDITIONNÉS.....	56
CO-CULTURES	57
MESURE DE L'ACTIVITÉ ALP	57
COMPTAGE	57
TEST DE MINÉRALISATION AU ROUGE ALIZARINE.....	57
TEST DE PROLIFÉRATION ALAMAR BLUE.....	58

PREMIERE PARTIE : IMPLICATION DE L'OSTÉOPROTÉGÉRINE ET DES PÉRICYTES DANS LA FORMATION DE LA MÉTAPLASIE OSTÉOÏDE ET LA STABILITÉ DES PLAQUES ATHÉROMATEUSES CAROTIDIENNES	59
INTRODUCTION.....	59
ARTICLE 1	60
DEUXIEME PARTIE : FORMATION DES CALCIFICATIONS ARTÉRIELLES AU SEIN DES PLAQUES ATHÉROMATEUSES FÉMORALES ; PARALLÈLE ENTRE LA FORMATION DE CALCIFICATIONS ECTOPIQUES ET LE MÉTABOLISME OSSEUX.....	79
INTRODUCTION.....	79
ARTICLE 2 (SOUMIS, ATHEROSCLEROSIS)	80
TROISIEME PARTIE : ETUDE DE LA RELATION PÉRICYTES- MONOCYTES/MACROPHAGES DANS LA FORMATION DES LÉSIONS ATHÉROMATEUSES (PARTIE EN COURS)	93
INTRODUCTION.....	93
RÉSULTATS.....	94
<i>Les péricytes ont un pouvoir chémo-attractant sur les monocytes.....</i>	<i>94</i>
<i>Les péricytes favorisent la différenciation des monocytes en macrophages de type M2</i>	<i>95</i>
<i>Les monocytes influencent la capacité de minéralisation des péricytes.....</i>	<i>96</i>
<i>Effet des monocytes sur les capacités d'angiogénèse des péricytes</i>	<i>96</i>
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	97
LA FORMATION DES CALCIFICATIONS ARTÉRIELLES EST UN PROCESSUS COMPLEXE ET ENCORE INCOMPLÈTEMENT ÉLUCIDÉ.....	97
ÉLÉMENTS APPORTÉS PAR CE TRAVAIL.....	98
<i>Métaplasie ostéoïde.....</i>	<i>98</i>
<i>Péricytes et OPG.....</i>	<i>98</i>
BILAN	101
PUBLICATIONS.....	101
AUTRES	101
REFERENCES	102

PREAMBULE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet d'étude des lésions athéromateuses dont l'origine vient d'une observation clinique: les lésions athéromateuses sont très différentes selon les territoires artériels. Ces différences de phénotypes sont fondamentales car elles participent directement à l'expression clinique des lésions, c'est-à-dire qu'elles conditionnent la symptomatologie des patients mais également l'évolution clinique après traitement. Partant de cette observation, le projet d'Etude Comparative des Lésions Artérielles (ECLA) est né sous l'impulsion du Pr Gouëffic. ECLA est une biocollection d'échantillons humains, plaques d'athérome, plasmas, données cliniques, issus de patients opérés pour artériopathie athéromateuse. Cinq territoires sont concernés, à savoir les artères carotides, aortes thoracique ou abdominale, artères fémorales et artères de jambes (Fig. 1). Le travail d'étude de cette biocollection a lieu au sein du Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse, UMR-U957, sous la direction du Pr Dominique Heymann. L'équipe qui a permis l'obtention de ces résultats est actuellement composée des Pr Dominique Heymann et Yann Gouëffic, du Dr Marie-Françoise Heymann, de Mathias Chatelais, Florian Guilbaud et de moi-même. Récemment, elle s'est enrichie de l'arrivée du Dr Thibaut Quillard. Ce projet comporte enfin un versant génomique avec étude de l'ARN des tissus artériels récupérés au bloc opératoire (ECLA-Gen), et ce sous la supervision du Dr Marja Steenman (Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291 l'Institut du Thorax- IRT).

L'étude de cette biocollection a pour but d'apporter des éléments descriptifs et mécanistiques des lésions artérielles périphériques avec une approche comparative. Un des premiers résultats a été que la composante calcique de la plaque semble être un des aspects clé à l'origine de l'hétérogénéité des lésions artérielles. Ainsi, les lésions artérielles iliaques et fémorales sont-elles fréquemment très calcifiées alors que les lésions carotidiennes sont généralement plus riches en lipides. L'observation détaillée des calcifications a mis en évidence l'existence d'un véritable tissu osseux ectopique au sein de la paroi artérielle. Les calcifications artérielles sont présentes de manière tout à fait courante le long de l'arbre artériel et leur présence a longtemps été associée à un processus passif résultant du vieillissement ou contemporain de la maladie athéromateuse. Les découvertes faites depuis une quinzaine d'années ont clairement montré qu'il s'agissait d'un phénomène actif récapitulant l'ossification physiologique. Ces calcifications se développent dans l'intima, associées à l'athérosclérose et dans la média, plutôt en lien avec le diabète et l'insuffisance rénale chronique. Elles influent sur de nombreux paramètres cliniques comme la stabilité des plaques d'athérome, la modification de la rigidité de la paroi artérielle (hypertension, insuffisance cardiaque) et sur le comportement des lésions vis-à-vis de l'implantation d'un matériel étranger de type ballon ou stent. D'un point de vue mécanistique, le lien entre tissu osseux et calcifications artérielles est omniprésent et est illustré par des désordres communs tels l'ostéoporose, les arthropathies inflammatoires, les désordres du métabolisme phospo-calciques. La formation des calcifications ectopiques est un phénomène extrêmement complexe et encore incomplètement compris. Il s'agit d'un domaine où l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques reste à venir et permettra de traiter des lésions

spécifiques dans lesquelles la composante calcique est au premier plan. Cette thématique passionnante est riche car au croisement de plusieurs domaines que sont l'étude du tissu osseux, du tissu artériel et de l'ingénierie tissulaire. Cette thèse se focalise sur l'aspect minéral des lésions artérielles avec un double objectif de caractérisation des lésions avec une approche comparative, mais également un objectif mécanistique de compréhension des phénomènes sous-jacents à la formation des calcifications artérielles.

L'introduction aura pour but de rappeler les éléments cliniques et biologiques nécessaires à la compréhension et à la formulation des hypothèses de travail. Par la suite, la présentation des résultats se fera en trois différentes parties, correspondant aux objectifs de la thèse et aux hypothèses de travail: **(i) Dans la première partie, l'objectif sera de montrer que la formation de métaplasie ostéoïde stabilise les lésions carotidiennes ce qui se traduit cliniquement par le caractère asymptomatique de ces lésions. De plus, on testera l'hypothèse que l'ostéoprotégérine est potentiellement un marqueur plasmatique de la stabilité de ces lésions carotidiennes. Enfin, cette partie explore le rôle des péricytes vasculaires et de l'ostéoprotégérine dans la formation de la métaplasie ostéoïde; (ii) La deuxième partie vise à caractériser la présence de métaplasie ostéoïde au niveau fémoral et à explorer également le rôle des péricytes vasculaires et de l'ostéoprotégérine dans sa formation; (iii) La troisième partie, encore en cours, se focalise sur la relation entre péricytes vasculaires et monocytes-macrophages et sur l'implication potentielle de cette relation sur l'athérome et la formation des calcifications artérielles.**

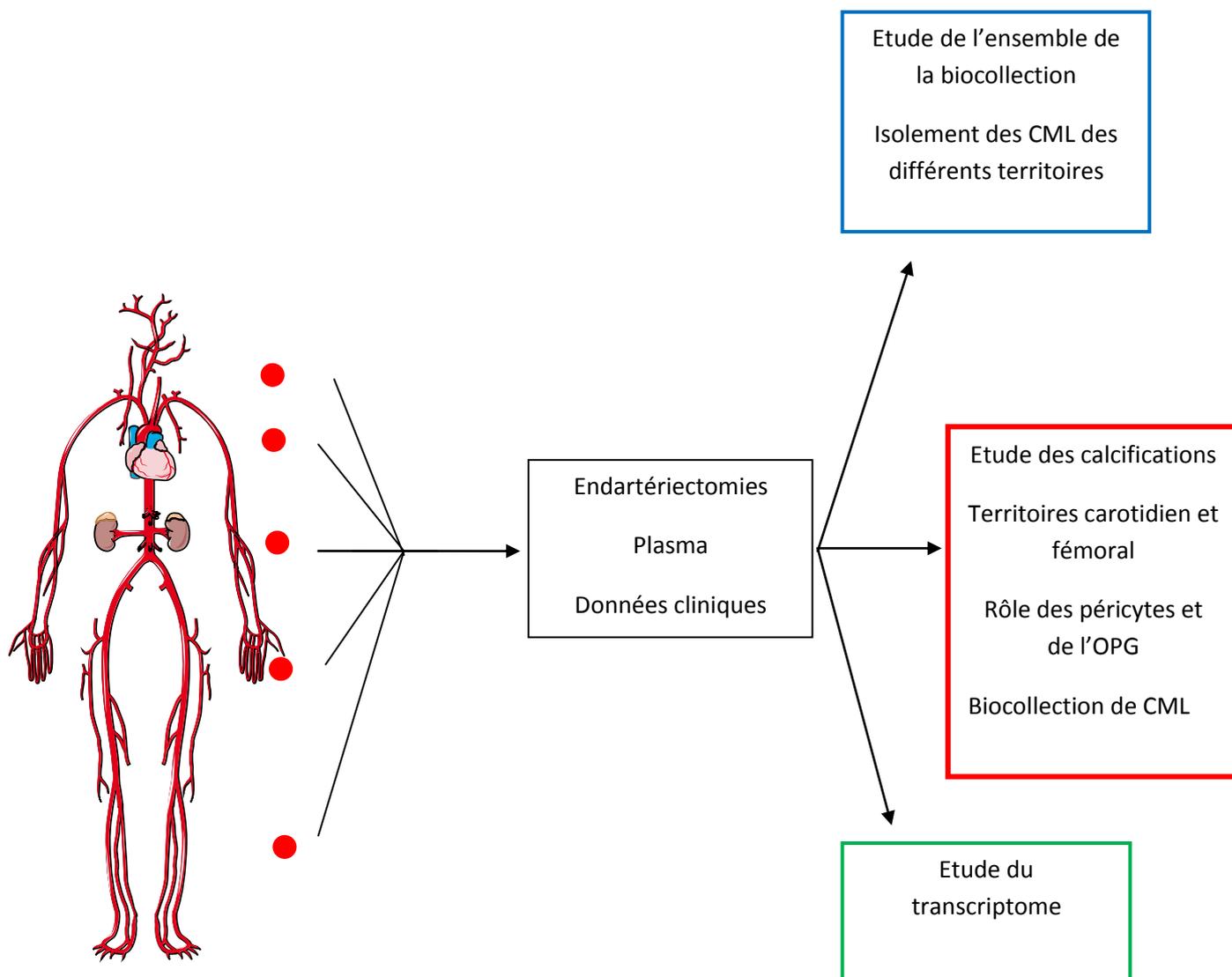


Figure 1 : Représentation schématique du projet ECLA-Gen : biocollections artérielles issues de 5 territoires (carotides, aortes thoraciques et abdominales, fémorales et axes de jambes), plasmas, données cliniques.

— Travail de thèse : Etude descriptive des calcifications des territoires carotidien et fémoral. Identification du rôle des péricytes et de l'ostéoprotégérine (OPG) dans la formation des calcifications artérielles. Constitution de la biocollection de cellules musculaires lisses des 5 territoires.

— Projet ECLA : Poursuite du travail de thèse en l'étendant à l'étude des calcifications aux autres territoires artériels. Etude comparative du rôle des cellules musculaires lisses des différents territoires dans la formation des calcifications artérielles.

— Versant génomique du projet ECLA-Gen : étude du transcriptome des différents territoires.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier

Jean-Baptiste Michel, Catherine Boisson Vidal et David Magne de me faire l'honneur de juger ce travail.

Dominique Heymann, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire lors de mon Master 2 puis au cours de cette thèse. Ton encadrement bienveillant m'a permis de mener à bien ce travail. Je te remercie pour ta grande disponibilité, ton soutien et tes précieux conseils.

Marie-Françoise Heymann, pour son aide et son encadrement. Merci pour tes conseils, ton aide en histologie. Travailler avec toi est un réel plaisir.

Yann Gouëffic, pour m'avoir encadré au cours de cette thèse et au-delà dans ma formation clinique. Travailler à ton contact est très enrichissant et productif.

Marja Steenman, pour ta disponibilité et tes explications.

Mathias Chatelais, merci pour ton aide. L'année passée ensemble a été aussi profitable qu'agréable. Merci aussi pour ton efficacité et tes idées.

Régis Brion, pour ton aide et ta disponibilité au tout début lors de mon M2 et par la suite. Je te dois beaucoup de manips.

Meadhbh Brennan, pour ton soutien au labo et tous les bons moments partagés.

Florian Guilbaud, pour ton aide dans la constitution et l'analyse de la biocollection.

Carine Montagne et Annie Guillard pour avoir géré la biocollection avec beaucoup de rigueur et de bonne humeur; c'est toujours un plaisir de travailler avec vous.

Béatrice Delassalle, pour ton aide et tes explications qui ont fait de moi le brillant statisticien que je suis aujourd'hui...

Pierre Layrolle, pour tes conseils et tes idées, tu en as de nouvelles tous les jours. J'espère qu'on aura l'occasion de travailler ensemble par la suite.

Frédéric Blanchard, pour tes conseils dans les manips et ton savoir.

Je tiens à remercier toute l'équipe du LPRO: j'ai beaucoup aimé travailler en votre compagnie, l'ambiance est studieuse et agréable. Je ne citerai pas tout le monde mais j'ai eu de très bons moments avec vous. J'y ai rencontré des collègues très agréables et j'y ai maintenant beaucoup d'amis avec qui je ne manquerai pas de garder le contact.

A Papa, Maman, Marion, Pierre, Régine, Eolia, Adèle et Clara.

ABREVIATIONS

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

Rappels sur la paroi artérielle

L'arbre artériel conduit le sang du cœur vers les réseaux capillaires. Le calibre des artères décroît de l'aorte jusqu'aux artérioles et leur constitution varie en fonction de ces niveaux. Cependant, à tous les niveaux, on retrouve des structures histologiques de conduction cardio-vasculaire et de conservation de la pression sanguine (fibres et lames élastiques, cellules musculaires lisses organisées en faisceaux circulaires). (13-15)

La paroi artérielle comporte schématiquement 3 tuniques concentriques:

- *l'intima*, au contact de la lumière, constituée par un endothélium associé le plus souvent à une membrane basale puis à une couche sous-endothéliale.
- La média est faite de cellules musculaires lisses, matériel élastique et d'une matrice extracellulaire
- L'adventice, composée de tissu conjonctif relativement lâche.

L'intima et la média sont facilement observées en échographie ultrasonore ou Echo-doppler qui permet notamment de mesurer l'épaisseur de l'intima-média (IMT ou Intima-Media Thickness) qui est augmentée par les facteurs de risques cardiovasculaires classiques (HTA, dyslipidémie, tabagisme, diabète, âge et sexe). Cet examen permet d'objectiver précisément une infiltration pariétale athéromateuse, de la dépister à son début, et plus tard de caractériser l'importance d'une plaque athéromateuse et son retentissement hémodynamique.

Les artères se terminent de 2 manières :

- Mode anastomotique (majorité des organes) où les artères forment un réseau de connexions superficielles et profondes avec, en cas d'occlusion d'une branche, suppléance par une autre grâce aux anastomoses.

- Mode terminal où chaque branche est indépendante de la branche voisine, sans anastomose; la distribution est bien ordonnée, rapide, efficace, bien répartie de manière équivalente dans tout le parenchyme de ces organes sensibles à l'anoxie, mais a une conséquence importante en pathologie puisqu'une occlusion d'une branche entraînera la nécrose du territoire irrigué, sans suppléance possible, avec installation d'infarctus (myocardiques, cérébraux, rénaux, spléniques, rétiniens...)

La vascularisation de la paroi des artères est particulière:

Les artères d'un calibre supérieur à 1mm doivent recevoir des vaisseaux nourriciers (« vasa vasorum »). Ces vasa vasorum, issus de petites artères et veine cheminant le long des artères à desservir, se distribuent à l'adventice et aux 2/3 externes de la média pour ce qui concerne l'aorte; le 1/3 interne de la média et l'intima étant nourri à partir de la lumière.

On distingue 3 différents types d'artères en fonction de leur calibre et de leur structure:

Les artères élastiques

Comprennent les gros vaisseaux situés près du cœur: aorte, tronc brachio-céphalique, artères sous-clavières, artères rénales et une artère de moyen calibre, l'artère mammaire interne. Ce sont des vaisseaux de conduction ou de transmission ou de conservation de la pression. Leur intima est assez épaisse, reposant sur une lame basale avec une couche conjonctive sous-endothéliale. La couche endothéliale est composée de cellules endothéliales aplaties, jointives grâce à des jonctions serrées et des jonctions communicantes ayant un rôle mécanique. La couche sous-endothéliale est assez épaisse et constituée de collagène, de microfibrilles élastiques et de protéoglycanes mêlées à quelques CML particulières (« cellules myointimales »). La limitante élastique interne (LEI), barrière interne de la média, n'est souvent pas nettement individualisée. La média est épaisse et comporte plusieurs dizaines (70 à 80 couches au niveau de l'aorte thoracique) de couches de lames élastiques concentriques à orientation hélicoïdale, le pas de l'hélice alternant d'une lame à l'autre. Un seul type cellulaire est présent, la cellule musculaire lisse, qui s'organise de façon très ordonnée. La média est riche en fibres élastiques associées à des faisceaux de fibres de collagènes. L'adventice, relativement mince, est riche en collagène. Elle sert de couche externe protectrice apportant l'innervation aux micro-vaisseaux appelés vasa vasorum qui pénètrent la partie externe de la média au niveau de l'aorte. En dehors de l'aorte (1/3 externe), les parois artérielles sont avasculaires rendant le tissu artériel difficile d'accès à l'extravasation des leucocytes circulants.

Les artères musculaires

De moyen calibre, ce sont les ramifications des troncs artériels précédents: artères des membres et des viscères, artères cérébrales et coronaires, artères radiales, fémorales, tibiales. Ce sont des vaisseaux de distribution. Leur intima est fine, leur sous-endothélium très mince, acellulaire chez le nouveau-né et constitué de glycosaminoglycanes et de quelques fibrilles élastiques et collagéniques. La limitante élastique interne est bien individualisée et fenêtrée par de petits orifices permettant des échanges de cellules et de substances entre intima et média. La média est plus ou moins épaisse selon le calibre, encadrée par la limitante élastique interne et la limitante élastique externe (moins épaisse que l'interne). La média est constituée d'une couche à orientation circulaire de CML ayant un phénotype contractile, enrobées de quelques fibres collagènes et élastiques. Les CML ont un aspect fusiforme, de 25 à 50µm de long et sont entourées d'une lame basale, en étroite connexion avec celle-ci, et avec la matrice interstitielle par l'intermédiaire de protéines membranaires assurant les jonctions cellule-matrice. Elles sont également connectées entre elles par des jonctions inter-cellulaires de type macula adherens, hémi-desmosomes et jonctions communicantes. Les artères musculaires de petit calibre comportent une dizaine de couches de CML et une fine limitante élastique interne sans limitante élastique externe. L'adventice est épaisse et essentiellement constituée de faisceaux de fibres collagène où se mêlent des fibres élastiques.

Les artérioles

Ce sont les branches artérielles terminales qui s'ouvrent sur les lits capillaires. Elles sont reconnues d'une part par leur petit calibre (diamètre inférieur à 0,3 millimètre) mais aussi par leur structure: leur intima est réduite à l'endothélium reposant sur la lame basale. Leur média dépend, schématiquement, du calibre:

- Les artérioles de 0,3 mm à 50 μ comportent une LEI et 2 à 3 couches de CML.
- Les artérioles de moins de 50 μ sont habituellement dépourvues de LEI et disposent d'une couche de CML circulaires.

L'adventice est fine et constituée de fibres de collagènes, parfois de fibres élastiques et fusionne avec le tissu conjonctif environnant.

Les artérioles jouent un rôle vasomoteur fondamental, participent à la régulation du lit capillaire et sont essentiellement responsables des résistances périphériques (maintien de la pression artérielle).

Cette classification n'est pas toujours aisée, certaines artères étant à cheval sur le plan histologique entre une artère de conductance et une artère de résistance (14) (Fig. 2).

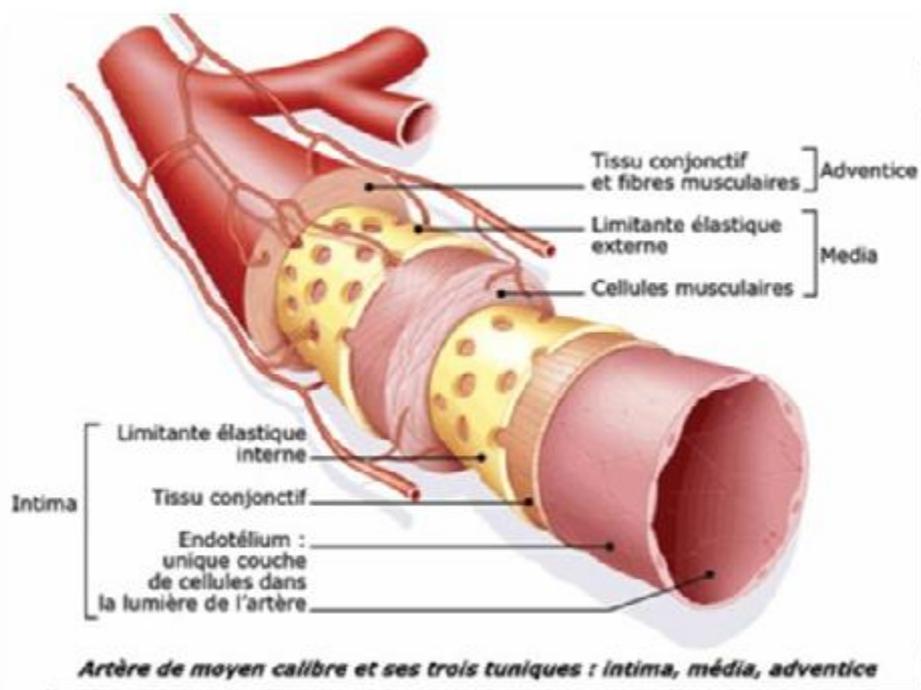


Figure 2: Schéma d'une paroi artérielle normale

Athérosclérose

Le terme d'athérosclérose vient du grec *athere* (bouillie) et *scleros* (dur). L'athérosclérose est définie selon l'OMS (1958) comme une « association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyens calibres, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang

et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la média » (15). L'athérosclérose est la principale cause de décès dans les pays industrialisés (16, 17). Chaque année on dénombre environ 120 000 infarctus du myocarde et 130 000 accidents vasculaires cérébraux. L'incidence de l'athérosclérose est en progression constante dans les pays en voie de développement. Il s'agit d'une pathologie artérielle inflammatoire chronique faisant intervenir les lipoprotéines modifiées, les cellules inflammatoires, les macrophages et lymphocytes T ainsi que les éléments cellulaires de la paroi artérielle. Cette inflammation chronique conduit à un processus réactionnel cicatriciel de la paroi artérielle impliquant les CML et la production de matrice extra-cellulaire. Certaines de ces lésions inflammatoires, pour des raisons encore non complètement élucidées, vont conduire à des lésions compliquées par rupture ou érosion de plaque avec présentation clinique variable en fonction du territoire artériel touché. L'atteinte coronaire et l'infarctus du myocarde dominant par leur fréquence et leur sévérité, suivis de près par les atteintes carotidiennes et les accidents vasculaires cérébraux. L'atteinte des membres inférieurs est également fréquente et conduit à l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs. Il faut noter enfin que la maladie reste souvent silencieuse et le patient longtemps asymptomatique (15).

Anatomopathologie de l'athérosclérose humaine

L'athérosclérose touche l'intima des artères de gros et moyen calibres. Elles peuvent se développer sur les artères élastiques et les artères musculaires. Les lésions sont d'abord dites précoces, infracliniques, puis progressent suivant les différentes étapes de l'athérogénèse vers les lésions sévères, plaques avancées réduisant le calibre artériel et à risque de complications cliniques.

L'American Heart Association (AHA), a établi une classification des lésions artérielles d'athérosclérose en six stades (18, 19).

Lésions de type I ou lésions initiales

Lésions microscopiques, présentes essentiellement chez les enfants et les adolescents. Elles sont caractérisées par une infiltration dans l'intima de cellules spumeuses macrophagiques, en petit nombre, et détectables uniquement par examen microscopique. L'accumulation de ces cellules dans l'intima va induire une augmentation nette de l'adhésion des monocytes à l'endothélium et favoriser l'évolution vers le stade II de ces lésions.

Lésions de type II ou stries lipidiques

Il existe une accumulation, dans la couche sous-endothéliale de l'intima, de phagocytes, en petits amas, formant des lésions visibles macroscopiquement : les stries lipidiques. Les cellules spumeuses sont considérées comme étant des macrophages mais cette activité phagocytaire est considérée par d'autres comme étant le fruit des CML. Les lipides présents sont surtout à l'intérieur des cellules, représentés par les esters de cholestérol, le cholestérol et les phospholipides. Ces lésions sont recouvertes par un endothélium. Deux types de lésions de type II sont distinguées. Les lésions de type

Iia, les plus rares, vont donner naissance aux lésions de type III. Elles sont caractérisées par la présence de plusieurs couches superposées de CML. Les lésions de type Iib contiennent peu de CML, ne progressent pas ou que peu. Ces lésions initiales (types I et II) peuvent être observées avec une incidence élevée, proche de 50%, chez les sujets de plus de 1 an. Leur fréquence diminue durant l'enfance, puis augmente à nouveau à l'adolescence pour toucher deux tiers des sujets dans la tranche des 10-15 ans.

Lésions de type III ou pré-athéromateuses

Lésions intermédiaires entre les types II et IV, elles sont irréversibles. Elles apparaissent entre 10 et 20 ans chez l'homme. Histologiquement, elles sont caractérisées par des gouttelettes lipidiques extracellulaires. Ces dépôts lipidiques sont identiques à ceux rencontrés dans les lésions de type II mais sont plus nombreux et localisés. Ils sont présents à proximité des multi-couches de phagocytes et cellules spumeuses, remplacent la matrice extracellulaire de protéoglycanes et de fibres, et repoussent les CML en position intima. Comme dans les lésions de type II, de nombreuses CML intimes contiennent des gouttelettes lipidiques. Ces lésions restent infra-cliniques.

Lésions de type IV ou athéromateuses

Présentes chez l'homme de 20 à 30 ans, ces lésions sont caractérisées par une augmentation des pools de vésicules lipidiques extracellulaires. Ceux-ci atteignent la confluence et fusionnent pour former le cœur lipidique. Ce cœur lipidique est une zone de faible cellularité. Il précède la formation du tissu fibreux et désorganise profondément l'intima. Les CML et les fibres de la MEC sont très dispersées par les particules lipidiques. Les cristaux de cholestérol font leur apparition, en particulier au niveau extracellulaire. Des dépôts de calcium apparaissent, ainsi que des capillaires qui bordent le cœur lipidique. Les phagocytes et cellules spumeuses et lymphocytes T sont plus concentrés à la surface de la lésion, mais la zone entre le cœur lipidique et la surface endothéliale reste la couche de protéoglycanes du sous-endothélium normal, même si elle est très infiltrée par les cellules inflammatoires et des cellules gorgées de lipides. Ces lésions vont pouvoir évoluer soit vers la plaque fibreuse (type V), soit vers la plaque rompue (type VI).

Lésions de type V ou fibro-athéromateuses

Ces lésions apparaissent après 40 ans. Elles sont caractérisées par la production de tissu fibreux dans l'intima. Le tissu fibreux est riche en fibres de collagène et en CML riches en réticulum endoplasmique granuleux. Ce tissu fibreux entoure le cœur nécrotique et forme la chape fibreuse. Elle peut présenter des calcifications qui s'accumulent préférentiellement dans les centres nécrotiques. Elle peut aussi être majoritairement fibreuse. La réaction fibrotique constituée de CML et de MEC domine la lésion, le cœur nécrotique et les cellules inflammatoires. Les lipides disparaissent de ce type de lésions. Ces lésions de type V entraînent généralement une sténose artérielle, sans retentissement pour

un vaisseau comme l'aorte, mais capables d'induire une sténose significative pour des artères comme les coronaires ou les artères carotidiennes.

Lésions de type VI dites compliquées

La survenue de la plaque compliquée est une étape importante dans l'évolution de l'athérosclérose, car elle va être responsable de la majorité des événements aigus. Elle survient généralement après 40 ans. Elles suivent les lésions de type IV ou V et peuvent présenter plusieurs aspects.

Les lésions de type VIa se caractérisent par l'apparition de fissures à la surface de la lésion. Il existe une simple perte de la couche endothéliale ou une érosion avec simplement une perte de substance superficielle (20, 21). La fissuration peut être également plus profonde, atteignant le cœur nécrotique et entraînant le relargage de gouttelettes lipidiques dans le sang circulant, emportant parfois la totalité de la plaque, et perforant de façon exceptionnelle la média pouvant conduire à l'apparition de faux-anévrismes.

Les lésions de type VIb se caractérisent par l'apparition d'une hémorragie ou d'un hématome intraplaque, suite à la rupture de néovaisseaux sous l'effet de contraintes hémodynamiques.

Les lésions de type VIc se caractérisent par l'apparition d'une thrombose. Le contact du sang circulant avec le sous-endothélium et le cœur nécrotique permet l'initiation du processus thrombotique avec l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sanguines et la formation d'un thrombus pariétal. Si la thrombose survient dans des artères de moyen calibre, elle peut être rapidement occlusive. En l'absence de thrombus occlusif, l'incorporation dans la plaque du thrombus qui suit la fissuration de la plaque va contribuer au resserrement de la lumière artérielle et à l'évolution de la plaque. Une classification modifiée en 10 stades a été proposée en 2000 et est reprise dans le Tableau suivant (3).

Table 1. Modified AHA Classification of Atherosclerotic Lesions*

Type	Name	Characteristics	Definition
0	Normal intima or intimal thickening	No foam cells	No foam cells, may exhibit minor intimal thickening or lymphocyte infiltration
I	Foam cell lesions (intimal xanthoma)	Single isolated foam cells	Single isolated foam cells
II		Foam cell layers	Multiple foam cells (≥ 2 layers)
III	Intermediate lesion (pathological intimal thickening)	Pools of extracellular lipid with no or only few cholesterol crystals	Minor accumulations of structure- and colorless material displacing the normal structural components of the intima
IV	Lipid core plaque (fibrous cap atheroma)	Extracellular lipid core, also called necrotic core	Colorless cavity without extracellular matrix and containing spindle-shaped empty spaces (cholesterol crystals)
V		+fibrosis	+ Hyalinization (birefringent fibres)
VI	Complicated plaque	Surface defect, hematoma, or thrombosis	Surface defect, plaque hemorrhage, or luminal thrombus
VII	Calcified plaque (fibrocalcific plaque)	$\geq 50\%$ of plaque area calcified	$\geq 50\%$ of plaque area calcified, with or without lipid core
VIII	Fibrous plaque (fibrocalcific plaque)	Fibrous plaque without a lipid core	Fibrous plaque with hyalinization without any lipid core (unless the core has undergone complete calcification)
IX	Chronic occlusion (total occlusion)	Chronically occluded artery	Artery occluded by plaque and connective tissue, no fresh thrombus

*Based on the updated¹⁷ histological classification of atherosclerotic lesions endorsed by the AHA. Type VI was graded as the underlying lesion without complications. Alternative terms proposed by Virmani et al¹⁶ are shown in parentheses.

Table 1: Classification modifiée de l'AHA (3)

Physiopathologie

L'athérosclérose est considérée avant tout comme une maladie inflammatoire (22). La présence de taux plasmatiques élevés de cholestérol, en particulier de low-density lipoprotein (LDL) est un des principaux facteurs de risque d'athérosclérose. Néanmoins, l'athérosclérose ne se résume pas à l'accumulation de lipides dans la paroi artérielle. D'ailleurs, les interventions sur l'amélioration du mode de vie et l'utilisation de traitement hypolipémiants (23, 24) n'ont pas éradiqués l'athérosclérose qui reste la première cause de décès aux Etats-Unis, en Europe et dans beaucoup de pays d'Asie (16, 17). L'élément initial de l'athérosclérose est la dysfonction endothéliale qui apparaît suite à la présence de LDL modifiés, de radicaux libres causés par le tabagisme, d'hypertension, de diabète, de facteurs génétiques favorisants, de taux plasmatiques élevés d'homocystéine, d'agents infectieux tels que les virus de type herpès ou *Chlamydia pneumoniae*. L'adhésion plaquettaire et des leucocytes se trouve augmentée, ainsi que la perméabilité endothéliale. L'endothélium développe des propriétés pro-coagulantes au lieu d'être anti-coagulant et produit des molécules vasoactives, cytokines et facteurs de croissance. Si cette réponse adaptative ne parvient pas à contrôler l'agression subie, l'inflammation se poursuit. Il s'ensuit une migration-prolifération des CML qui s'associent à une zone inflammatoire pour former une lésion intermédiaire. Puis, il se produit un épaississement du mur artériel, avec dilatation progressive du vaisseau afin de préserver le calibre de la lumière artérielle (25), un phénomène appelé remodelage expansif. La réponse inflammatoire est médiée principalement par des monocytes-macrophages et par des lymphocytes T (26). L'accumulation de ces cellules depuis la circulation et par multiplication au sein de la lésion augmente avec la durée du processus inflammatoire. L'activation de ces cellules conduit à la libération d'enzymes hydrolytiques, cytokines, chémokines et facteurs de croissance (27), qui ont eux-même un effet d'aggravation des lésions et génèrent de la nécrose. Ces éléments sont apportés sur le site de la lésion par les néo-vaisseaux se développant au sein des lésions à partir de l'adventice. L'accumulation de ces cellules inflammatoires, combinée avec la prolifération-migration des CML et la formation d'un tissu fibreux, favorise la croissance de la lésion qui devient plus importante, recouverte d'une chape fibreuse et centrée par un cœur nécrotique. Quand le phénomène de remodelage est dépassé, la lésion progresse dans la lumière artérielle réduisant son calibre et le flux sanguin. Ces étapes sont illustrées dans la Figure 3.

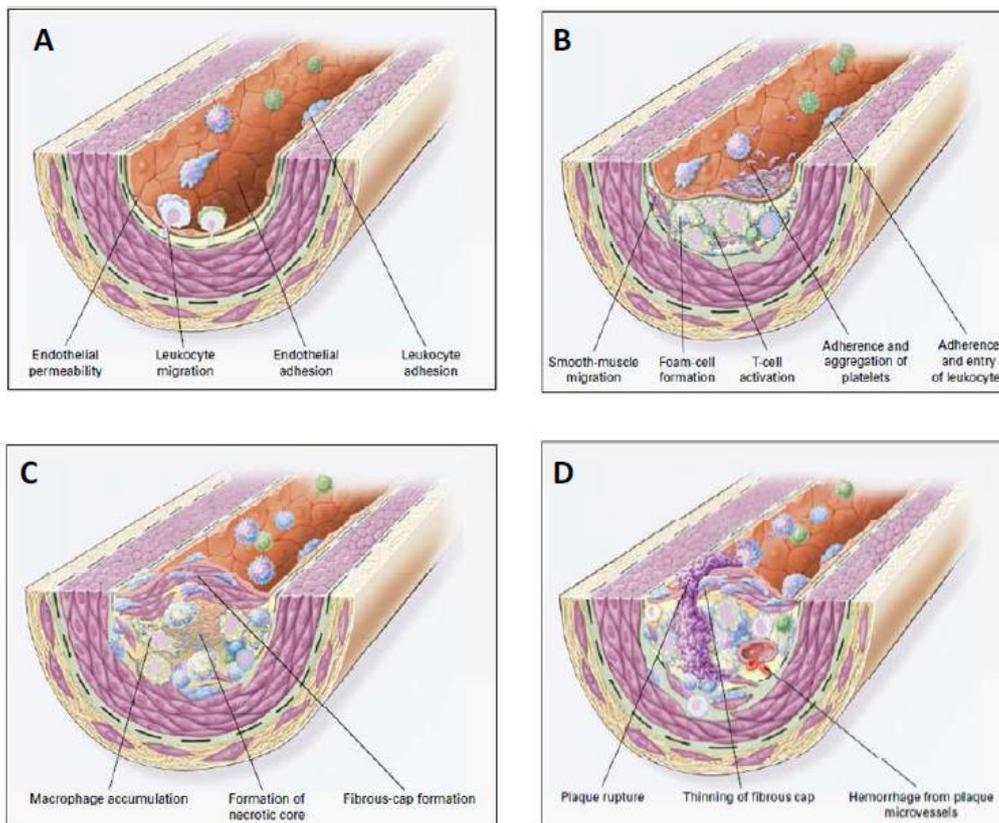


Figure 3: Les différentes étapes de l'athérogénèse (22): A: Dysfonction endothéliale. B: Strie lipidique. C: Lésion avancée avec formation de la chape fibreuse. D: plaque instable compliquée avec rupture.

Hypercholestérolémie et LDL-oxydés

Les LDL peuvent être modifiés par oxydation, glycation (dans le diabète), par aggrégation, ou par association avec les protéoglycans (28). Les LDL oxydés causent des dégâts majeurs auprès des cellules endothéliales et CML. Lorsqu'ils sont présents au sein de la paroi artérielle, ils sont internalisés par les phagocytes via leur fixation sur les scavenger receptor à la surface de ces cellules (28) qui deviennent des cellules spumeuses activées et produisent de l'urokinase et des cytokines inflammatoires comme l'IL-1 (29). Il s'agit d'un mécanisme visant à protéger l'endothélium et les CML de l'agression causée par les LDL-oxydés. Ces derniers ont également des propriétés chémoattractives vis-à-vis des autres monocytes induisant une augmentation de l'expression du M-CSF (30) et du monocyte chemotactic protein (31) par les cellules endothéliales amplifiant encore plus la réponse inflammatoire. Cette dernière va à son tour modifier le comportement de la paroi artérielle vis-à-vis des lipoprotéines. En particulier, les médiateurs de l'inflammation tels que le TNF- α , l'IL-1

et le M-CSF vont augmenter l'adhésion des LDL aux CE et CML et augmenter la transcription du gène du LDL-récepteur (32), suivant un véritable cercle vicieux.

Hypertension

L'angiotensine 2, principal produit du système rénine-angiotensine aldostérone, est souvent retrouvée avec des taux élevés dans le plasma des patients hypertendus. Il s'agit d'un puissant vasoconstricteur. Il contribue également à l'athérogénèse en stimulant la croissance des CML. L'angiotensine 2 se fixe sur des récepteurs spécifiques à la surface des CML, induisant l'activation de la phospholipase C, augmentant l'entrée de calcium dans la cellule et augmentant la contraction des CML, la synthèse de protéine et l'hypertrophie de ces cellules. Cela augmente également l'activité de la lipoxigénase des CML et favorise l'oxydation des LDL et l'inflammation (33).

Infection

Plusieurs travaux ont établi la présence de deux micro-organismes, herpès virus et Chlamydia pneumoniae, comme associés à l'athérosclérose (34). Bien que le rôle causal ne soit pas établi, leur présence a été notée dans des lésions athéromateuses lors d'études autopsiques.

Développement de la réponse inflammatoire

Les zones de bifurcations artérielles, naissance de collatérales ou plicatures sont particulièrement sensibles à la formation de lésions athéromateuses, en raison des altérations du flux sanguins qui s'y produisent avec réduction du shear stress et apparition de turbulences (35). Ces modifications hémodynamiques induisent un changement dans l'expression génique de molécules d'adhésion au niveau des cellules endothéliales, comme par exemple les gènes codant pour les molécules d'intercellular adhesion molecules 1 (36), platelet derived growth factor B chain (37), et le facteur tissulaire (38). L'endothélium et les CML, mais aussi les monocytes, vont également produire, en réponse à ces changements de flux, des molécules chémo-attractantes telles le monocyte chemoattractant protein 1, l'ostéopontine ou des LDL oxydés (39). Ces changements vont finalement grandement déterminer les zones où va se développer préférentiellement l'athérome en favorisant les phénomènes de rolling et d'adhésion des monocytes et des lymphocytes T. Le monocyte est présent dans toutes les étapes de l'athérogénèse. Les macrophages dérivant des monocytes sont des phagocytes et des cellules présentatrices d'antigènes. Elles sécrètent des cytokines, chémokines, facteurs de croissance et des métalloprotéinases. L'entrée en continu, la survie et la réplication des macrophages dans les lésions dépendent en partie de facteurs comme le macrophage colony-stimulating factor et le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor pour les monocytes et l'IL2 pour les lymphocytes. A l'inverse, les cytokines inflammatoires comme l'interféron- γ activent les macrophages et peuvent induire leur mort cellulaire programmée ou apoptose. Ce phénomène, *in vivo*, fait des macrophages des acteurs majeurs contribuant à la formation du cœur nécrotique caractéristique des lésions avancées. Alors qu'initialement les CML étaient considérées comme les seules cellules à proliférer dans les lésions

d'athérome, on sait désormais que les macrophages et les lymphocytes T ont cette capacité et contribuent sans doute autant que les CML à l'expansion des lésions (40). D'autre part, la synthèse par ces macrophages de cytokines (TNF α , IL-1, TGF-B), d'enzymes protéolytiques (en particulier des métalloprotéases), et de facteurs de croissance (par ex PDGF et IGF I) est très probablement déterminante dans les phénomènes de dommages et réparations ayant lieu au sein des lésions au cours de leur évolution. Les macrophages expriment des molécules de CMH de classe II comme HLA-DR à leur surface leur permettant de présenter des antigènes aux lymphocytes. Par conséquent, il n'est pas surprenant qu'une réponse immunitaire à médiation cellulaire ait lieu dans l'athérogénèse, puisque à la fois les CD4 et les CD8 sont présents dans les lésions (41). Les cellules T activées suite à cette présentation d'antigène sécrètent des cytokines dont l'IFN- γ , TNF- α et β , qui amplifient à leur tour la réponse inflammatoire. Ce rôle de cellule présentatrice d'antigène peut également être assuré par les CML (41).

L'adhésion des plaquettes et la formation d'un thrombus mural sont déterminants dans l'initiation et la progression des lésions d'athérosclérose chez l'homme et l'animal (42). Les plaquettes peuvent adhérer à l'endothélium, au collagène sous-endothélial ou aux macrophages en cas de dysfonction endothéliale. L'activation consécutive des plaquettes va aboutir à la libération de leurs granules qui contiennent des cytokines, facteurs de croissance et, avec l'action conjuguée de la thrombine, contribuent à la migration et à la prolifération des CML et des macrophages (43). L'activation plaquettaire conduit également à la formation d'acide arachidonique, qui peut être transformé en prostaglandine comme le thromboxane A₂, un des plus importants vasoconstricteurs et agrégants plaquettaires ou en leukotriène qui va amplifier la réponse inflammatoire (42). Les plaquettes sont fondamentales afin de maintenir l'intégrité vasculaire en l'absence de lésion et de prévenir l'apparition d'hémorragies spontanées. Ainsi, en cas de lésion, les plaquettes s'accumulent et recrutent d'autres plaquettes sur la paroi artérielle conduisant à l'expansion du thrombus.

Aspects cliniques des complications des plaques athéroscléreuses

Outre les thromboses précédemment évoquées, les plaques athéroscléreuses peuvent donner des embolies. Ces embolies sont cruoriques lorsque le matériel qui s'échappe dans la circulation est un embole de plaquettes et de fibrine. Ces embolies sont suites aux ulcérations superficielles. Lorsqu'elles sont plus profondes, l'embole va être constitué du contenu lipidique du centre nécrotique, on parle alors d'embolies de cristaux de cholestérol. De nombreux territoires peuvent être touchés: peau, tube digestif, rein, membres inférieurs. Les anévrismes artériels, définis par une perte de parallélisme des bords endoluminaux, représentent une autre complication de l'athérosclérose. Ils sont dominés par un amincissement de la média avec perte des CML remplacées par de la fibrose (44). Ceci est particulièrement fréquent au niveau de l'aorte abdominale. Enfin, on peut citer les faux-anévrismes, hématomes pariétaux et dissections artérielles. Les ulcères pénétrants de la paroi aortique correspondent à des fissurations profondes de plaques athéroscléreuses aortiques (lésions de type VIa).

Leur survenue peut induire plusieurs types de pathologies en fonction de la profondeur de la perforation de la paroi artérielle. De faux-anévrysmes, par hématome intra-pariétal peuvent être observés (45) et l'évolution peut être plus grave et donner lieu à des dissections artérielles (46).

La notion de plaque instable est fondamentale. Les manifestations cliniques en lien avec l'athérome sont le fait de complications aiguës ou chroniques de la plaque athéromateuse. Une plaque dite instable ou vulnérable peut brutalement se compliquer, s'ulcérer, provoquant ainsi une thrombose et/ ou des embolies. Les plaques instables sont caractérisées par une chape fibreuse fine 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 (47).

On insistera ici sur l'artériopathie périphérique. Elle résulte 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 (48). Elle est la principale cause d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) et d'amputations, conduisant à une détérioration majeure de la qualité de vie et de l'autonomie. De plus, l'artériopathie périphérique est reconnue comme marqueur de la gravité de la maladie athéromateuse. L'étude BASIL a montré que plus de 50% des patients présentant une ischémie critique des membres inférieurs étaient décédés dans les trois ans (49). La principale étiologie de l'artériopathie périphériques est l'athérosclérose. Sa physiopathologie et ses facteurs de risque sont les mêmes que ce 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.

Concept d'hétérogénéité artérielle et projet ECLA

Actuellement, de plus en plus de travaux suggèrent l'existence d'une hétérogénéité de l'expression des lésions athéromateuses en fonction du territoire. Tout d'abord, on constate que certaines artères ne développent pas ou que peu d'athérome, comme l'artère mammaire interne. Celle-ci est donc utilisée de manière privilégiée pour la réalisation des pontages coronaires. La perméabilité et la survie sont meilleures qu'avec un greffon saphène ou un stent actif dans le traitement des coronaropathies (50). Cette supériorité du greffon en artère mammaire interne peut être attribuée à sa plus grande résistance à la survenue de lésions athéroscléreuses. L'endothélium de l'AMI présente peu de fenestrations, une faible perméabilité au niveau des jonctions intercellulaires et une quantité importante de molécules anti-thrombotiques comme l'héparane sulfate, l'activateur plasminogène tissulaire et une production élevée d'oxyde nitrique. Ces éléments rendent cette artère imperméable au passage des lipoprotéines et des cellules inflammatoires qui sont responsables du développement de l'athérosclérose (51). De même, au niveau du membre inférieur, l'artère fémorale profonde est longtemps épargnée par la

maladie athéromateuse en comparaison de l'artère fémorale superficielle et représente un segment clé en cas de revascularisation chirurgicale. Après un traitement chirurgical, il existe des différences importantes en termes de résultats à long terme selon le territoire envisagé. L'aorte abdominale et ses branches (comprenant les artères fémorales), est plus fréquemment le siège de récurrences des lésions que le territoire des branches de la crosse aortique et de l'aorte viscérale (52). Ceci est également le cas pour ce qui est des traitements endovasculaires. L'utilisation de matériel endovasculaire de type ballon ou stent est devenue extrêmement fréquente de nos jours et on dispose désormais de recul sur les résultats de ces techniques. Celles-ci sont peu invasives et ont transformé notre spécialité, mais leur limitation majeure reste la survenue de resténose. Il s'agit d'un phénomène de cicatrisation artérielle consécutif à l'agression de la paroi artérielle par le stent. Lorsqu'il devient trop excessif, il conduit à la resténose avec réduction de la lumière interne et du flux sanguin d'aval. Ce phénomène correspond à l'enchaînement de plusieurs processus à commencer par le rappel élastique de la paroi artérielle, phénomène biomécanique faisant suite à l'inflation d'un ballon dans la lumière artérielle. Puis, suit un dépôt précoce de plaquettes et de cellules inflammatoires. Plus tardivement, on observe une prolifération-migration des CML de la paroi. Enfin, ces dernières sécrètent une matrice extracellulaire abondante et acquièrent un phénotype cicatriciel. Les études cliniques ont montré que la fréquence de survenue des resténoses variait considérablement d'un territoire à l'autre. Ainsi, la fréquence de la resténose à un an après angioplastie au ballonnet, associé ou non à l'implantation d'une endoprothèse métallique (stent), est de 6 à 9 % au niveau carotidien, 20% au niveau fémoral et de 30 à 40 % au niveau fémoral superficiel (53, 54). Concernant les artères de plus petit calibre, telles que les artères jambières, les taux de resténose intra-stent dépassent ceux observés dans le réseau coronarien (30-50 % versus 10-35 %) (55, 56). D'autre part, il est intéressant de noter que la cinétique de la resténose est différente selon les territoires. Le taux de resténose maximum des artères coronaires était atteint à 6 mois (57). Ce n'est pas le cas des artères fémorales où le plateau semble se situer à 12 mois (54). Afin de prévenir et de traiter la resténose intra-stent, des stents à relargage de substances anti-prolifératives (stents actifs) ont été développés. Deux familles de molécules sont utilisées, les limus (sirolimus, évérolimus) inhibant la voie m-Tor (58) et le paclitaxel, un inhibiteur des microtubules. L'efficacité des stents actifs varie également selon les territoires artériels traités. Dans les artères coronaires, un taux de resténose coronaire de 0 % à 9 mois après l'implantation d'un stent actif a été rapporté (59). Ces taux sont beaucoup plus élevés au niveau des artères fémorales et jambières, dépassant les 20% (60, 61). Jusqu'à ce jour, les stents actifs n'ont pas fait preuve de leur efficacité pour réduire la resténose intra-stent dans les artères périphériques. En effet, les essais cliniques n'ont pas montré de différence significative en termes de resténose intra-stent entre le stent nu et le stent actif pour les territoires artériels vertébral, rénal, fémoral superficiel ou jambier (62, 63). La nature de la plaque d'athérome est un facteur déterminant dans la survenue de la resténose intra-stent. En effet, différentes études du réseau coronaire par échographie endocoronaire ont montré que la nature de la plaque était un facteur prédictif de resténose. Il a été démontré que les plaques peu calcifiées (soft plaque) étaient

plus sujettes à la resténose intra-stent (64-66). Cependant, ces études ne précisent pas la nature histologique et le rôle des composantes minérale, lipidique et inflammatoire dans le mécanisme de resténose.

Peu de travaux se sont attachés à caractériser les lésions artérielles selon le territoire. Quelques études basées sur l'imagerie non invasive ont décrit une distribution des lésions artérielles calcifiées en fonction du site, à partir d'acquisition corps entier (67). Le score calcique est une méthode mise au point initialement pour les artères coronaires, afin de mesurer la charge calcique, donnant un reflet indirect de l'étendue des lésions athéromateuses. La méthode la plus utilisée est la méthode d'Agatston, approche semi-quantitative basée sur le nombre, la surface et la densité Hounsfield des calcifications (68). Cette technique appliquée au corps entier a ainsi montré que la prévalence des calcifications augmentait avec l'âge, et qu'il existait des disparités en termes de charge calcique en fonction des territoires. Ainsi le score calcique médian était-il plus élevé au sein des artères iliaques qu'au sein des artères carotidiennes (69). Cependant, même si les dépôts calciques ne sont quasiment présents qu'en association avec l'athérome au niveau coronarien, cette technique ne préjuge pas de l'association des dépôts calciques à des lésions athéromateuses au sein des autres territoires, pour lesquels des lésions de médiocalcose pourraient être surajoutées. Quelques travaux réalisés à partir de spécimens d'endartériectomies carotidiennes ont été publiés. La présence d'une métaplasie osseuse y était retrouvée dans 9 à 13 % des échantillons, tandis que, dans une de ces séries, 71 % des plaques présentaient des dépôts calciques (70-72).

Dans l'étude descriptive "**Etude Comparative des Lésions Athéromateuses**" (ECLA) (73), menée entre 2006 et 2009, nous avons comparé les plaques athéromateuses carotidiennes (n=48) et fémorales (n=48) de patients. Dans le même temps, les données cliniques ainsi que des prélèvements sanguins étaient recueillis. Une analyse histologique (classification AHA), calcique et lipidique de la plaque était réalisée. Un bilan sanguin phospho-calcique, lipidique et inflammatoire était effectué. Dans un premier temps, nous avons montré qu'il n'existait pas de différence significative entre les 2 groupes de patients en termes de caractéristiques démographiques, de facteurs de risque cardiovasculaires et de bilan biologique. Cependant, nous avons noté des différences à la fois quantitatives et qualitatives entre les plaques carotidiennes et fémorales. En effet les plaques carotidiennes étaient plus fréquemment de nature fibrolipidique (72 %) tandis que les plaques fémorales étaient plus fréquemment de nature fibrocalcique (93 %). Quatre types de calcifications ont été observées : micronodulaires, à centre clair, pavés et ostéoïdes. La prévalence de la métaplasie ostéoïde distinguait particulièrement les plaques fémorales (55 %) par rapport aux plaques carotidiennes (15 %). Sur le plan qualitatif, la teneur en calcium était plus élevée au sein des plaques fémorales, alors que la teneur en cholestérol était plus élevée au sein des plaques carotidiennes. Il apparaît clairement que les différences de composition entre les plaques d'athéromes représentent un facteur déterminant de l'hétérogénéité artérielle.

Les facteurs qui peuvent être à l'origine de ces différences ont plusieurs origines possibles. L'histologie est un premier élément à considérer. Les artères élastiques et musculaires présentent des compositions différentes en termes de teneur en CML, fibres collagènes et élastiques, matrice extracellulaire, qui peuvent expliquer une formation différentielle des lésions en fonction de la nature élastique ou musculaire de l'artère. Cependant, les artères carotides et fémorales par exemple sont toutes les deux de type musculaire et présentent des comportements très différents en terme d'athérogénèse et de resténose. L'exposition aux facteurs de risque cardiovasculaire semble également avoir des propriétés localisatrices. En effet, le tabac est associé à des lésions athéromateuses plus importantes au niveau des membres inférieurs et des artères coronaires, tandis que l'hypertension artérielle est associée à des lésions athéromateuse intracérébrales (74). De plus, Baumgartner et *al.* ont retrouvé une corrélation entre certains facteurs de risques cardiovasculaires et le développement des lésions athéromateuses à l'étage iliaque, fémoro-poplité ou jambier (75). Les contraintes hémodynamiques exercées par les forces de cisaillement (shear stress) représentent clairement un facteur influençant le développement des lésions en modifiant l'expression génique des cellules endothéliales. Les forces de cisaillement ont été identifiées comme étant plus élevées au niveau carotidien que fémoral (76). Cependant, des travaux réalisés sur un modèle canin d'athérosclérose tempèrent cette hypothèse puisque la réalisation d'homogreffes entre aortes abdominales (athérosensibles) et thoraciques (athéro-résistante) a montré que les segments artériels gardaient leur sensibilité à l'athérome malgré le changement de position (77). L'origine embryologique des territoires artériels est également un élément intéressant à considérer. Les CML au niveau carotidien proviennent des crêtes neurales alors que les CML fémorales sont issues du mésoderme splanchnique (78).

L'observation confirme qu'un des éléments les plus frappants de cette hétérogénéité est la composante calcique de la plaque, influant sur le comportement clinique de celle-ci. Il est donc probable que la compréhension des mécanismes présidant à la formation des calcifications artérielles serait essentielle pour mieux appréhender les facteurs de cette hétérogénéité.

Calcifications Artérielles

Différentes catégories de calcifications artérielles

Les calcifications artérielles peuvent concerner l'ensemble de l'arbre artériel depuis l'aorte ascendante jusqu'aux capillaires et correspondent à quatre variantes histo-anatomiques (Fig. 4), chaque type étant associé à un spectre de pathologie vasculaire spécifique (79). Il s'agit de :

- La calcification intimale au cours de l'athérosclérose
- La calcification médiale
- La calcification valvulaire cardiaque
- La calciphylaxie

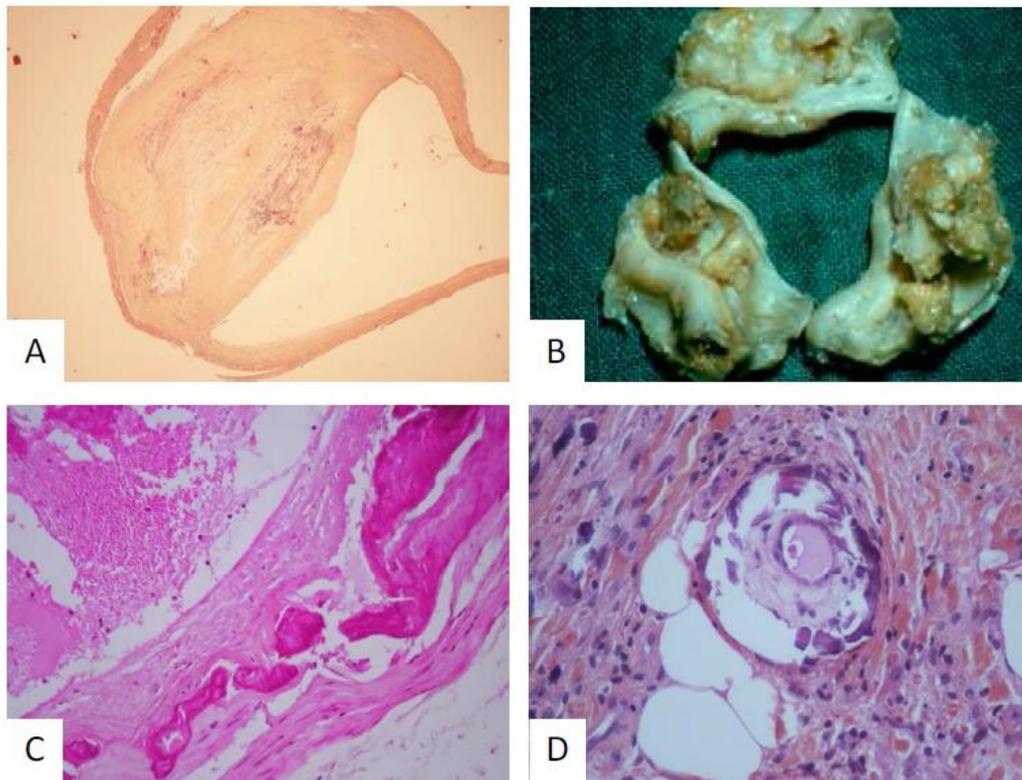


Figure 4: Les quatre variants histo-annatomiques

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

Les calcifications intimales sont caractéristiques de l'athérosclérose. Elles surviennent de manière disséminée (« patchy pattern ») dans les artères dont elles réduisent le calibre. Elles sont pourvoyeuses de sténoses, embolies et thromboses. Ces calcifications sont de type dystrophique 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 fibro-calcique, suivie par la formation de cartilage calcifié puis d'ossification

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, sont pourvoyeuses d'hypertension, d'insuffisance cardiaque, et augmentent le risque d'amputation chez les diabétiques de type 2 (80).

Les calcifications valvulaires cardiaques sont la résultante de stress mécaniques et de réactions inflammatoires aboutissant à une ossification non enchondrale. Aux étapes les plus précoces, il existe

une accumulation de lipides avec expansion du tissu adipeux au sein du tissu valvulaire, associé à un infiltrat macrophagique et lymphocytaire T (79).

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 (81).

Les calcifications artérielles reproduisent l'ossification physiologique

Les mécanismes à l'origine de la calcification artérielle survenant au cours de l'athérosclérose ne sont pas, comme initialement supposé, le résultat d'une précipitation passive avec dépôt de minéral au niveau des vaisseaux, mais semblent faire suite à des phénomènes hautement régulés présentant de nombreuses similitudes avec l'ossification physiologique (82). Selon ce modèle, la formation de calcifications dans la plaque athéromateuse correspond à deux types de processus semblables à la formation orthotopique du tissu osseux (83): ossification endochondrale avec calcification du cartilage médiée par les ostéoblastes et ossification intra-membraneuse avec calcification de la matrice extracellulaire médiée par les ostéoblastes.

Rappel sur l'ostéogénèse

L'ostéogénèse 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 déroulent 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 (Fig. 5) qui correspond soit à l'ossification périostique pour la 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 (Fig. 6).

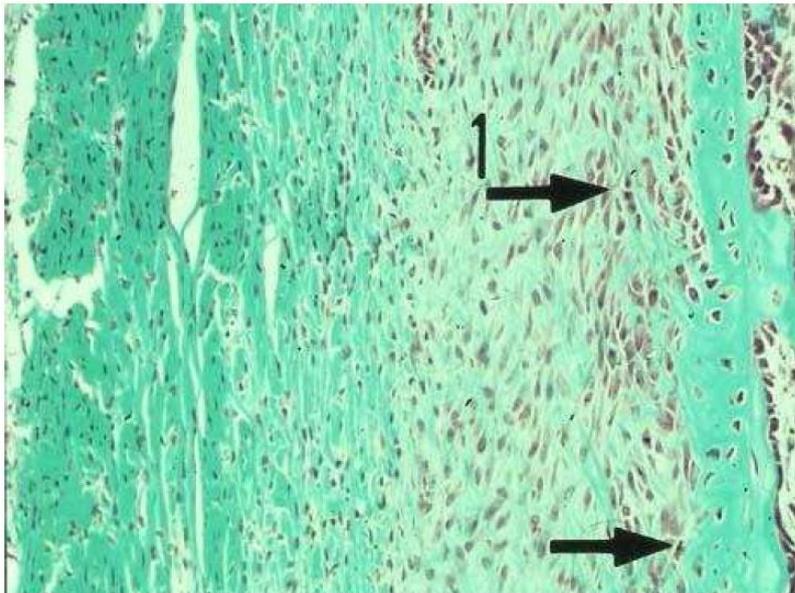


Figure 5: Ossification membraneuse (trichrome de Masson) (Atlas d'histologie humaine et animale- Thibaut et *al.*).

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.

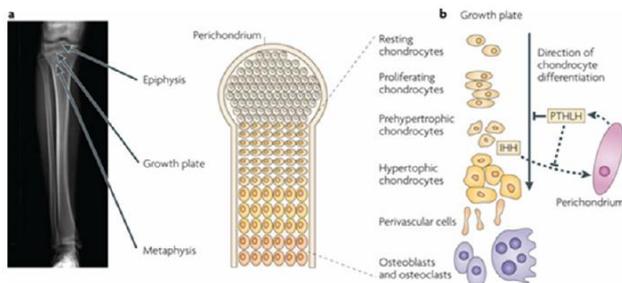
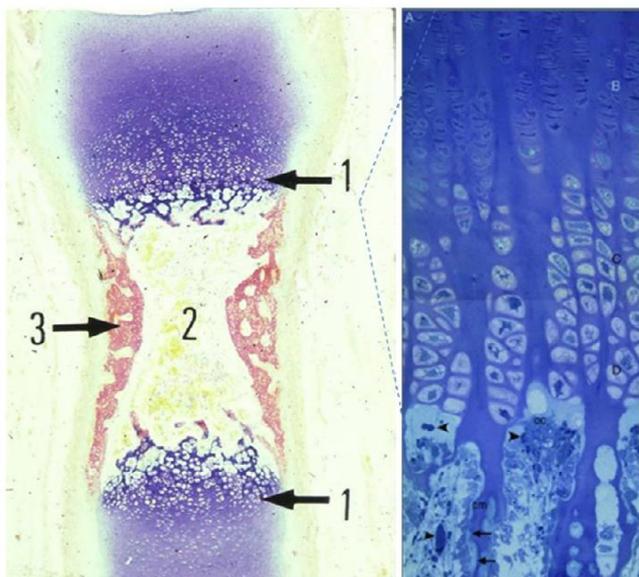


Figure 6: Ossification endochondrale (Bovée et *al.* 2010, Atlas d'histologie humaine et animale- Thibaut et *al.*). A ce stade, le processus d'ossification endochondrale se déroule en 1, à la base des épiphyses.

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".



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 quelques-uns, pour une raison encore 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 (84). 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 100µm 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 (85). 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 (86). Les protéines non-collagéniques (ostéocalcine, ostéopontine, ostéonectine), les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes (décrine, 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 phosphates 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.

Principaux mécanismes de régulation des calcifications artérielles

Comme développé précédemment, la formation de calcifications ectopiques en site artériel reproduit l'ossification endochondrale et de membrane ayant lieu durant l'embryologie grâce à la plasticité phénotypique des cellules de la paroi artérielle qui agissent comme des précurseurs mésenchymateux. Ce processus d'ossification, impliquant les bone morphogenetic proteins et des facteurs de transcription ostéochondrogéniques, est activé et modulé par un ensemble de désordres inflammatoires, métaboliques et génétiques, en particulier les dyslipidémies, l'insuffisance rénale chronique, le diabète, l'hyperparathyroïdisme et l'ostéoporose. Les calcifications artérielles font également suite à la perte d'inhibiteurs comme la fétuine A, la matrix Gla protéine et le pyrophosphate qui, à l'état physiologique, permettent de limiter l'ossification au tissu osseux. D'un point de vue téléologique, les calcifications des tissus mous serviraient à exclure des agents nocifs (infections chroniques, parasites, corps étrangers) en les séquestrant à l'intérieur d'un mur osseux.

Différenciation ostéochondrogénique et ostéoclastique de précurseurs cellulaires

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 (87). En outre, ces cellules étaient capables de produire des structures minéralisées *in vitro* (88). Ces résultats ont été confirmés par d'autres groupes, sur d'autres cellules artérielles comme les cellules musculaires lisses (89). Le terme de modèle de calcification active vient du fait que ces cellules sont capables de synthétiser du tissu calcifié. 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 (90). Nous l'avons vu, le remodelage osseux résulte d'un équilibre entre formation osseuse via les ostéoblastes et résorption via les ostéoclastes. La formation des calcifications artérielles pourrait faire intervenir également des cellules Oc like, et en particulier la perte d'activité de telles cellules, qui préviendraient la formation des calcifications vasculaires. En temps normal, différents facteurs influencent la survie et la différenciation des cellules OC like, comme le RANKL et le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), une cytokine et un 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 ostéoclastogéniques : le manque de M-CSF induit la réduction du nombre d'ostéoclastes et l'apparition d'une ostéopétrose (91). En contrepartie, des souris invalidées pour le M-CSF et l'apolipoprotéine E développent des

calcifications artérielles malgré une diminution significative des lésions athéromateuses (92). 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 (ce qui inhibe sa complication) (5) (Fig. 7).

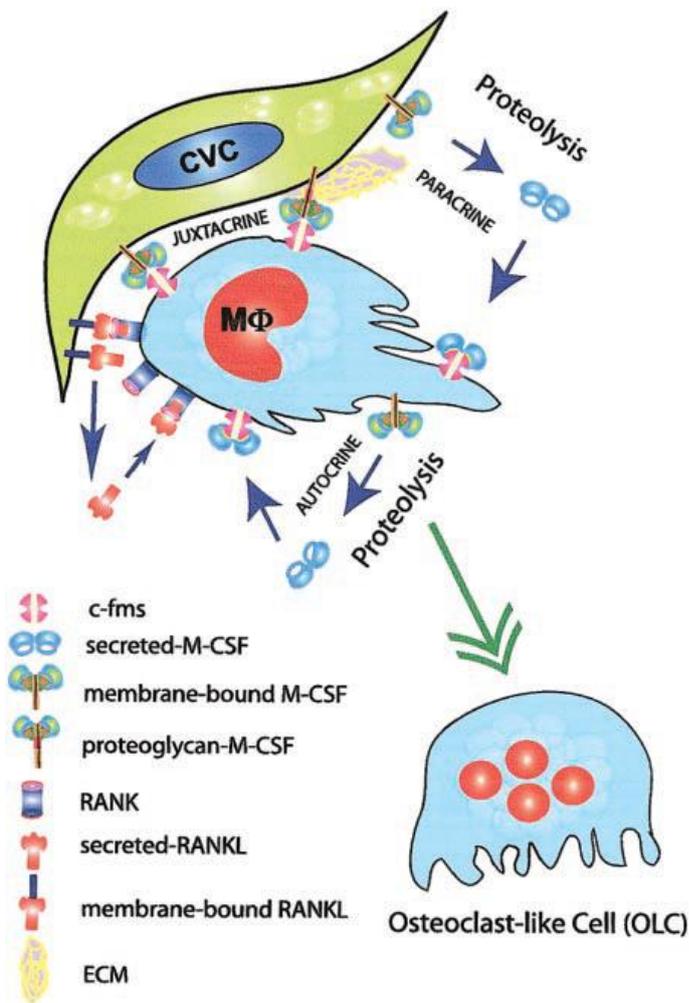


Figure 7: Mécanisme supposé de la formation des cellules de type ostéoclaste like dans la paroi artérielle à partir des macrophages lésionnels et implication de RANKL et M-CS (6). Les CVCs (Calcifying vascular Cells) sont les cellules osteoblast like de la paroi artérielle qui sécrètent le RANKL et le M-CSF. ECM: Extra Cellular Matrix

Initiation des calcifications artérielles par les vésicules matricielles

Si la différenciation ostéogénique des cellules est bien décrite, en revanche la formation aux stades précoces de l'athérosclérose des cristaux et microcristaux de calcium est encore incomplètement comprise. La formation de tissu minéral nécessite en principe la présence de collagène de type I et d'alkaline phosphatase (ALP). Le collagène de type I et l'ALP sont présentes et co-localisent dans les calcifications retrouvées dans les lésions d'athérosclérose (93) et sont produites par les cellules vasculaires *in vitro* (94, 95). Le collagène de type I, mais pas l'ALP, est présent dans la paroi artérielle. Dans la métaplasie ostéoïde, le cristal minéral est associé au collagène de type I fibrillaire. Durant les stades précoces, la cristallisation pourrait être initiée par les membranes vésiculaires extracellulaires, comme les vésicules matricielles ou les corps apoptotiques, qui contribuent à créer un microenvironnement riche en calcium et en phosphate et ces vésicules ont également à leur surface l'ALP (96). L'étude par microscopie électronique a montré que ces vésicules matricielles se trouvent à proximité des cellules en apoptose au sein des plaques d'athérome (97) et, après isolement, elles ont la capacité de fixer et concentrer le calcium et le phosphate, et d'initier la formation de cristaux (98, 99).

Développement des calcifications artérielles par perte des inhibiteurs physiologiques

Des dépôts minéraux peuvent également avoir lieu du fait de la perte d'inhibiteurs physiologiques. Ce phénomène est bien illustré par certaines maladies génétiques rares où des calcifications, majoritairement au niveau de la média, se développent de manière massive suite à la déficience d'une protéine impliquée dans le métabolisme du phosphate. Dans la maladie artérielle généralisée infantile (GACI), la déficience d'une enzyme appelée ectonucléotide pyrophosphatase-phosphodiesterase 1 (ENPP1), va empêcher la transformation de l'ATP extracellulaire en AMP et pyrophosphate, ce dernier étant un puissant inhibiteur de la formation des cristaux de pyrophosphate (100). Les patients atteints développent des calcifications artérielles extrêmement sévères de l'aorte et des artères coronaires, et le décès survient généralement après quelques jours de vie (101). De même, le pyrophosphate produit dans la cellule est exporté au niveau extracellulaire par une protéine transmembranaire, Ank, dont la déficience, étudiée chez les souris, conduit à la formation de calcifications artérielles et articulaires avec formation spontanée de métaplasie cartilagineuse (102). Une autre illustration est la déficience de l'enzyme CD73, présente à la surface de la cellule, qui agit immédiatement en amont de l'enzyme ENPP1 dans le métabolisme extracellulaire de l'ATP pour transformer l'AMP en adénosine et phosphate inorganique. La déficience de cette enzyme, suite à la mutation du gène correspondant appelé NT5E, résulte en l'apparition de calcifications artérielles massives uniquement au niveau des membres inférieurs, ainsi qu'en la formation de calcifications péri-articulaires (7). La formation des calcifications provient sans doute d'un manque de signalisation de l'adénosine sur ses récepteurs à la surface des cellules vasculaires. Cette activation via l'adénosine

aboutit en situation physiologique à la libération intracellulaire d'AMPc qui finalement inhiberait l'ALP. Le principal rôle de cette enzyme étant de transformer le pyrophosphate en phosphate inorganique (Fig. 8). Ceci suggère, qu'en permanence à l'état physiologique, des mécanismes luttent contre l'apparition des calcifications artérielles.

Il faut noter également que l'étude des calcifications médiales montre que celles-ci sont souvent associées à l'élastine plutôt qu'au collagène I (103, 104). L'élastine est un constituant important de la paroi artérielle et est retrouvée dans les plaques d'athérome (105, 106) où elle pourrait jouer un rôle dans la formation des calcifications. Ceci suggère que, même si la différenciation ostéo-chondrogénique de précurseurs cellulaires artériels et l'expression par ces cellules de protéines régulatrices sont présentes dans la formation des calcifications artérielles tout comme dans le tissu osseux, les calcifications vasculaires associées à l'élastine pourraient faire intervenir des mécanismes uniques et propres au tissu artériel.

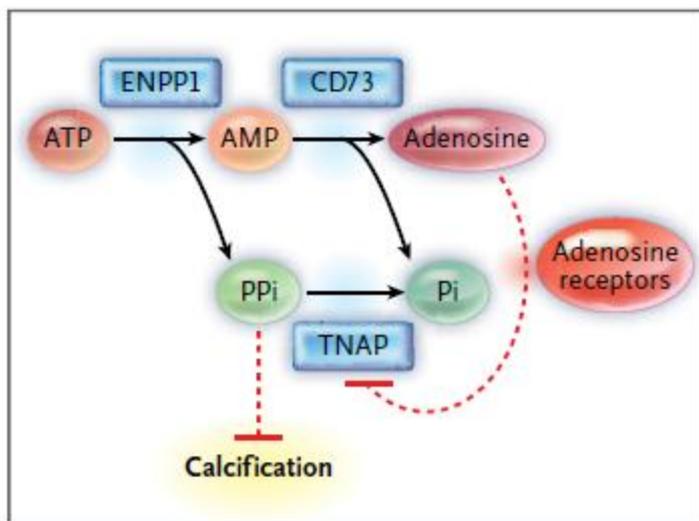


Figure 8: Mécanisme supposé conduisant aux calcifications artérielles impliquant la voie du métabolisme extracellulaire de l'ATP. A la surface des cellules, ENPP1 (ectonucléotide pyrophosphatase-phosphodiesterase 1) convertit l'ATP en AMP et pyrophosphate inorganique (PPi), et CD73 transforme l'AMP en adénosine et phosphate inorganique (Pi). La déficience de CD73 aboutit à un déficit en adénosine et en l'absence d'inhibition de TNAP (Tissue non-specific alkaline phosphatase). Il en résulte un excès de dégradation du PPi qui est un puissant inhibiteur de la formation des cristaux d'hydroxyapatite (7).

Facteurs de régulation

Facteurs développementaux

Plusieurs facteurs développementaux gouvernent l'ostéogénèse dans le tissu osseux et dans l'intima et la média des vaisseaux. Les facteurs de transcription clés comme *Msx2*, *Runx2*, *Ostérix* et *Sox9* induisent la différenciation des cellules en cellules de type ostéoblastes en agissant en aval sur les médiateurs que sont le collagène de type I, l'ALP, l'ostéopontine, et l'ostéocalcine.

Les 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, elles perdent leurs marqueurs musculaires lisses et entrent dans une phase de prolifération. Elles produisent alors des protéines de la matrice extracellulaire et deviennent des cellules de type ostéoblaste. La perte des marqueurs musculaires lisses est influencée par les BMP. BMP2 et BMP4 sont des facteurs de différenciation ostéogéniques qui ont la capacité d'induire *in vivo* la formation d'os ectopique dans le tissu musculaire et la minéralisation de cellules musculaires lisses *in vitro*. BMP2 agit via *Runx2* (107) qui entraîne l'expression du collagène de type I et de l'ALP. BMP2 est antagonisé par *noggin*, *chordin* et *MGP* (108). BMP4 est induit par *RANKL* dans les CML de rats (109). A l'inverse, BMP-7 favorise la formation du tissu osseux et le dépôt de phosphate dans le tissu osseux. Elle prévient ainsi de taux sériques hauts de phosphate et la formation 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 (110). L'effet protecteur contre les calcifications de cette molécule pourrait être compromis entraînant une calcification excessive.

Matrix Gla Protein : MGP est un inhibiteur des BMP. MGP est exprimée plus fortement dans la paroi artérielle humaine calcifiée que normale (93). Le rôle inhibiteur des calcifications artérielles de MGP a été mis en évidence par l'observation d'une ossification complète de l'aorte et de ses branches chez les souris déficientes en MGP (111). MGP agit selon deux mécanismes : liaison directe et inhibition des cristaux en formation, et liaison directe et inhibition de BMP2 (112). MGP est inhibée par HSP70 (113) ainsi que par le manque de vitamine K (114). La fonction de MGP est sous la dépendance d'une gamma-carboxylation par un résidu glutamate, étape inhibée par la warfarine. De manière logique, il a été observé une augmentation des calcifications artérielles au niveau fémoral chez les patients traités au long cours par de la warfarine (115).

Ostéoprotégérine (OPG) : l'OPG est produit par différents tissus et notamment par le système vasculaire. L'OPG est augmentée par les oestrogènes, le TGF- β et la BMP2. Son taux sérique est

diminué en cas 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 (Fig. 9). Une expression basse d'OPG conduit à une ostéoporose et des calcifications vasculaires, alors qu'une forte expression entraîne un ostéopérose (116, 117). Cliniquement, des taux sériques hauts d'OPG sont associés à l'athérosclérose ou à des facteurs de risque d'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 (117), mais son rôle exact reste encore controversé.

Ostéopontine (OPN): il s'agit d'une protéine acide extra-cellulaire. Les phosphosérines contenues dans l'OPN ont une 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 (118). 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 les artères normales, l'OPN est absente alors qu'elle est abondamment présente dans les plaques calcifiées (119).

RANKL : RANKL est exprimé par les ostéoblastes et est indispensable à la différenciation des ostéoclastes. RANKL voit ses taux plasmatiques augmenter avec l'âge et semble être un facteur prédictif des événements cardiovasculaires (120).

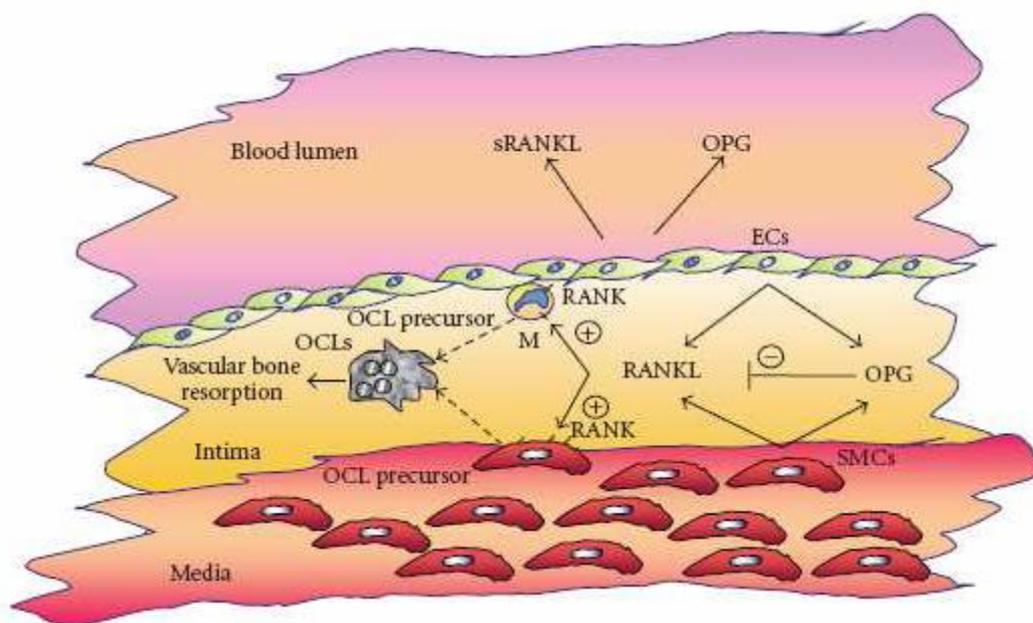


Figure 9: Axe OPG/RANK/RANKL dans la calcification de la plaque athéromateuse : diagramme du modèle de différenciation ostéoclastique (5). Du RANKL soluble et de l'OPG sont sécrétés dans la plaque athéromateuse et dans le flux sanguin essentiellement par les cellules musculaires lisses et les cellules 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.

Facteurs inflammatoires

L'inflammation est étroitement associée à la formation des calcifications. Les macrophages, lymphocytes et cellules dendritiques infiltrent la plaque et relarguent des cytokines inflammatoires qui régulent la formation des calcifications (121). L'inflammation du tissu adipeux périvasculaire (122) et l'inflammation systémique contemporaines de l'insuffisance rénale (123) pourraient également contribuer à la formation des calcifications intimaux et médiales.

TNF α : Le TNF α libéré lors de l'inflammation a été identifié à l'origine de l'activation de la cascade Mx2-Wnt-B-catenin (124), induisant la différenciation ostéogénique des pré-ostéoblastes lors de l'ossification de membrane mais aussi dans les vaisseaux de patients diabétiques et chez les souris hyperlipidémiques (124). Cette même cascade est aussi activée par les stress oxydatifs (125), et l'hyperphosphatémie (126). Le TNF α favorise les calcifications en induisant l'activité de l'ALP via la protéine kinase A (95). L'infliximab, anticorps monoclonal anti-TNF α , inhibe l'activation de Wnt et les calcifications chez les souris LDL-récepteur-knock out (124).

Fetuin A : La protéine Fetuin A est produite dans le foie, présente à haute concentration dans le sérum (0,4-1g/l) (127). Il s'agit d'une volumineuse molécule non dialysable (56kDa), capable de lier et de former un complexe avec les cristaux phospho-calciques, formant des particules calci-protéiques qui préviennent l'aggrégation de calcium et phosphate en cristaux minéraux insolubles et leur croissance. La Fetuin A favorise également la captation de ces complexes par les cellules. Elle s'accumule au niveau des sites présentant des calcifications artérielles (128). L'ostéopontine, une autre protéine associée à l'os, a également la propriété de s'associer à ces cristaux (129). *In vitro*, la Fetuin A a montré une capacité à réduire la minéralisation de la matrice extracellulaire de cellules musculaires lisses vasculaires (128, 130). Des taux faibles de Fetuin A sont associés à une augmentation des calcifications vasculaires et de la mortalité chez les patients insuffisants rénaux chroniques (127). Son effet est partiellement médiée par l'inflammation, et les taux sériques de Fetuin A sont positivement associés aux taux de CRP.

Cristaux : Les nanocristaux d'hydroxyapatite pourraient avoir un effet biologique direct sur les cellules par le biais d'interactions physico-chimiques qui induisent de l'inflammation et de l'apoptose (131, 132). Ce type d'effets est connu en ce qui concerne les cristaux de pyrophosphate et d'urate mais moins bien identifiés dans le cas des cristaux d'hydroxyapatite (133). Un cercle vicieux pourrait se produire lorsque l'inflammation induit la minéralisation et la minéralisation induit l'inflammation.

Facteurs métaboliques

Stress oxydant : le stress oxydant favorise les calcifications artérielles (134) et constitue un effecteur qui fait suite à la présence des cytokines inflammatoires et des lipides oxydés. L'H₂O₂ entraîne la différenciation ostéochondrogénique des CML vasculaires en stimulant l'expression de Runx2 (94).

Les taux de Reactive Oxygen Species (ROS) sont augmentés au niveau des valves cardiaques calcifiées (135). Les produits d'oxydation des lipides comme les LDL-oxydés induisent également la différenciation ostéogénique des CML vasculaires (136).

Hyperphosphatémie : le rôle de l'hyperphosphatémie dans la formation des calcifications médiales se formant dans le contexte de l'insuffisance rénale est crucial (103, 126). L'hyperphosphatémie favorise la formation des cristaux et entraîne également *in vitro* une augmentation de l'expression des gènes de différenciation ostéochondrogénique dans les CML vasculaires (107, 137). Les taux sériques de phosphates sont régulés par le phosphate lui-même, l'hormone parathyroïdienne, la vitamine D et par le facteur de croissance fibroblastique 23 (FGF-23), qui est relargué par les ostéocytes et active son co-récepteur Klotho au niveau rénal, ce qui régule l'élimination du phosphate (138).

Hormone parathyroïdienne (PTH): cette hormone de 84 acides aminés synthétisée par les glandes parathyroïdes est la principale hormone responsable de l'homéostasie calcique. Elle agit à plusieurs niveaux pour augmenter la concentration plasmatique du calcium. Sur le tissu osseux, la PTH stimule la résorption osseuse par activation des ostéoclastes via la production de RANKL par les ostéoblastes (139). Sur le rein, la PTH provoque l'excrétion urinaire de phosphore inorganique et la réabsorption des ions calciums. Enfin, elle augmente l'absorption intestinale de calcium et de phosphore (140). Au niveau du système vasculaire, la PTH prévient les calcifications des CML en inhibant l'activité phosphatase alcaline (141).

Vitamine D: cette vitamine est synthétisée sous la peau sous l'influence du soleil (rayonnement 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) puis une hydroxylation rénale qui aboutit au calcitriol (1, 2-dihydroxy vitamine 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 (vitamin D Binding Protein) (142). La toxicité à la vitamine D est un modèle animal usuel d'induction des calcifications vasculaires (143).

Glucose et insuline: les études sur les CML montrent que le glucose à lui seul stimule la minéralisation de ces cellules et que l'insuline l'inhibe (144, 145).

Implications cliniques des calcifications artérielles et perspectives thérapeutiques

Il est fondamental d'insister sur l'implication clinique des calcifications artérielles. Il n'est pas rare en effet d'examiner des patients et de constater sur des radiographies standards des calcifications tout à fait significatives et asymptomatiques. Ceci survient majoritairement chez les patients âgés et peut laisser à penser que les calcifications représentent un marqueur de vieillissement mais n'ont pas de morbidité propre. Bien au contraire, les calcifications sont reconnues comme un facteur de morbidité cardiovasculaire propre (115). Comme dit précédemment, les calcifications intimes sont associées à l'athérosclérose et les calcifications médiales à l'âge, l'insuffisance rénale et le diabète, et impliquent fortement le métabolisme du phosphate. Les premières vont être déterminantes quant à la stabilité de

la plaque et les deuxièmes vont générer de l'hypertension et de l'insuffisance cardiaque ainsi que de l'insuffisance d'organe par rigidification de la paroi artérielle. En pratique, les deux types de calcifications sont fréquemment observées chez les mêmes malades et les mécanismes en cause ont des points communs. Les situations cliniques où les calcifications artérielles sont au premier plan ne manquent pas: difficulté ou impossibilité de réaliser une anastomose vasculaire lors d'un pontage ou lors de la création d'une fistule artério-veineuse comme abord pour hémodialyse. Difficulté à implanter un greffon rénal en raison de calcifications iliaques massives. Dans le rétrécissement aortique calcifié, la problématique est la calcification massive de la valve. Les exemples sont fréquents également lors de l'emploi des techniques endovasculaires: difficulté de cathétérisme, perte de drogue lors de la mise en place de stent ou ballon actif, dissection artérielle. En particulier, les calcifications ont vraisemblablement une influence sur la survenue de fractures de stents (146, 147).

Il faut insister sur le fait qu'actuellement aucun traitement spécifique des calcifications artérielles n'est disponible, contrastant avec l'importance de leur impact clinique. De nombreuses découvertes restent à faire dans ce domaine afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et proposer de nouveaux traitements.

Triade OPG-RANK-RANKL et calcifications artérielles

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 antirésorption osseuse (148, 149). 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 (150)
- OCIF : Osteoclastogenesis Inhibitory Factor
- TR-1 : TNF Receptor-like molecule 1 (149)

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 (151).

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 (Fig. 10).

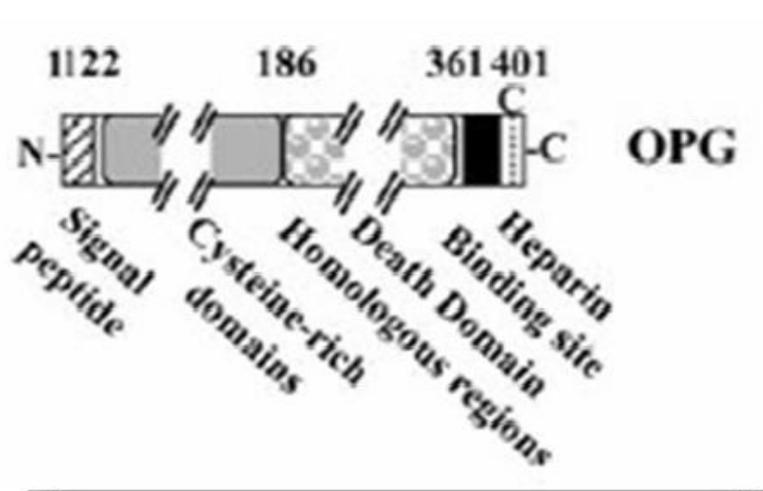


Figure 10 : Structure de l'OPG (1, 2). L'OPG est membre de la superfamille des récepteurs au TNF. C'est un récepteur soluble possédant en particulier un domaine de liaison à l'héparine, des domaines de mort et des domaines riches en cystéines. N : extrémité N-terminale ; C : extrémité C-terminale.

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 riches en cystéine (D1-D4) participent à l'activité anti-ostéoclastique de l'OPG. En effet, c'est 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») (Fig. 11). 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 (151). Le dernier domaine (D7) possède un site de liaison à l'héparine essentiel pour l'interaction de l'OPG avec les protéoglycanes et glycosaminoglycanes (152-154) notamment aux cellules de myélome via le syndecan-1 (155). 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 (156).

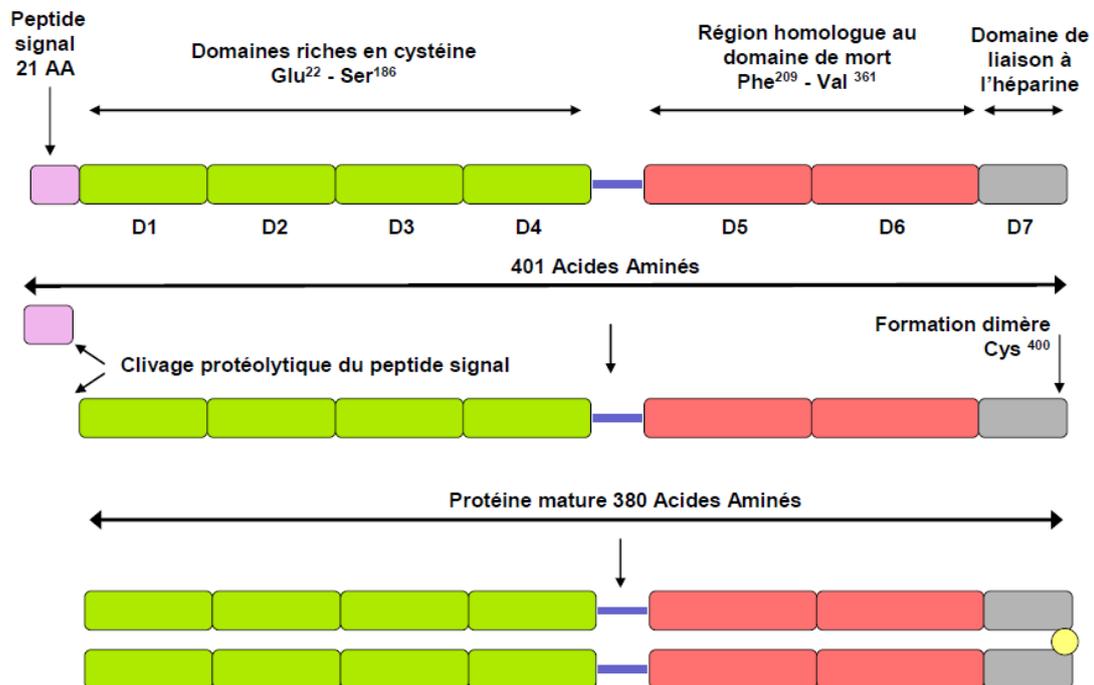


Figure 11 : Structure de l'OPG (9). L'OPG est sécrétée principalement sous une forme dimérique biologiquement plus active que la forme monomérique.

b) Sources :

L'OPG est une molécule présente dans le tissu osseux, la peau, le foie, les poumons, le coeur, les artères, les veines, les reins, le placenta, les glandes mammaires et le cerveau, et est donc considérée comme ubiquitaire (117, 148, 149). 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 (150, 157). Enfin, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses (158), les fibroblastes, les monocytes et les ostéoblastes humains en culture primaire expriment fortement l'OPG (159), ainsi que des cellules tumorales de cancers du sein ,de prostate ou de thyroïde (9, 160).

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) (1, 161-163). La PTH et la prostaglandine E2 ont, au contraire, un effet inhibiteur sur l'expression de l'OPG (164). Les glucocorticoïdes diminuent également l'expression d'OPG et contribuent à l'apparition d'ostéoporose chez les patients traités à long terme avec ces molécules (165).

d) Fonctions :

Les fonctions de l'OPG sont résumées dans la Figure 12.

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 (148). 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 (116). Ces phénomènes sont réversibles après l'injection intraveineuse d'OPG recombinante (166).

L'OPG fonctionne en réalité comme un récepteur compétiteur de RANKL empêchant ce dernier de se lier à RANK. 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 (1). 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 (167). Ces activités biologiques sont à mettre en relation avec la capacité de l'OPG à se lier au syndécan-1 (168).

Le système vasculaire est une cible de l'OPG

Les souris OPG^{-/-} présentent également des calcifications de l'aorte et des artères rénales (116). 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 (169). L'OPG est présente dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, associée au facteur de von Willebrand (170, 171). En réponse à des stimuli inflammatoires (comme le processus d'athérosclérose), l'OPG est relarguée des corps de Weibel-Palade dans la cellule endothéliale, pouvant jouer un rôle dans l'atteinte endothéliale et l'angiogenèse (170-172). Des travaux ont montré que l'OPG protège la cellule endothéliale du détachement et de l'apoptose (173, 174) et induit la formation de structures capillaires en « cordons »

à partir de cellules endothéliales humaines de veine ombilicale cultivées sur matrigel (173). 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 moelle hématopoïétique et, par là même, la formation *in vivo* d'une néoangiogénèse vasculaire. Cette molécule pourrait donc avoir un rôle dans la revascularisation des tissus (172) et contribuer à l'angiogénèse tumorale (175, 176). Par ailleurs, en se fixant à TRAIL et en bloquant son activité pro-apoptotique, l'OPG est un facteur de survie des cellules endothéliales (177, 178). 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 (141, 179). 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 (180).

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 (181). 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 (148). 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 (116). 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 (152) mais il se fixe également à TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) (177). TRAIL est une cytokine de la superfamille du TNF produite au sein des tumeurs par les monocytes en réponse à l'interféron- γ ou - α et correspond au principal médiateur de l'activité cellulaire anti-tumorale acquise (182, 183). La cellule normale semble être insensible à l'action de TRAIL, servant de base à l'utilisation de TRAIL comme drogue anti-cancéreuse (184). Si initialement, les domaines de mort présents sur l'OPG avaient été suspectés d'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 (153). 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 (177). 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 (9). Ces travaux suggèrent donc un effet pro-tumoral direct de l'OPG dans certains cancers.

L'OPG peut enfin interagir avec des molécules de la famille de l'héparine, et ce, par son domaine de liaison spécifique (151). 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(155, 185) et que l'OPG est capable d'induire un chimiotactisme des monocytes en se fixant au syndecan-1 (168).

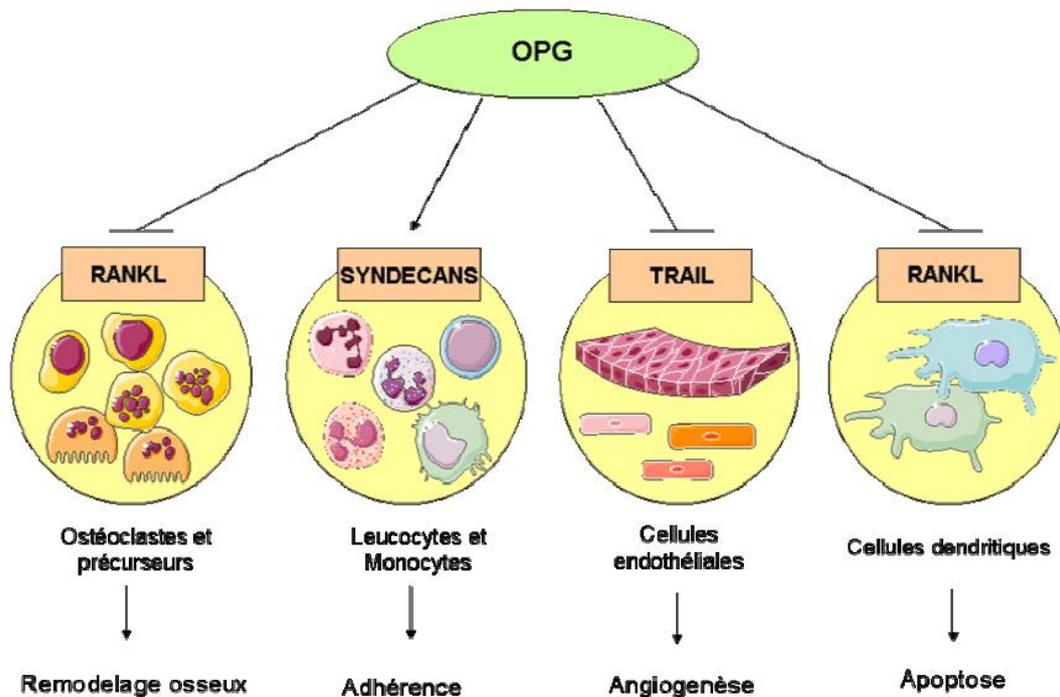


Figure 12 : Fonctions de l'OPG. Par sa capacité à se fixer à de nombreux ligands (RANKL, TRAIL, protéoglycane, facteur von Willbrand), l'OPG est un récepteur à activités pléiotropes agissant sur trois systèmes biologiques principaux : le système ostéoarticulaire, le système immunitaire et le système vasculaire.

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 (149), et l'autre à partir de cellules myélomonocytaires murine 32D (186). RANKL est un polypeptide membre de la superfamille du TNF. Différentes acronymes ont été donnés à ce facteur :

- OPG : 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 (186).

a) Structure :

RANKL est une protéine transmembranaire de type II (partie N-terminale intracellulaire) sans peptide signal (159). Elle montre une homologie d'environ 30% avec TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et CD40, et d'environ 20% avec Fas- Ligand (187). Que ce soit chez la souris ou chez l'homme, RANKL existe sous trois isoformes résultant de l'épissage alternatif d'un même gène (2, 188) (Fig. 13).

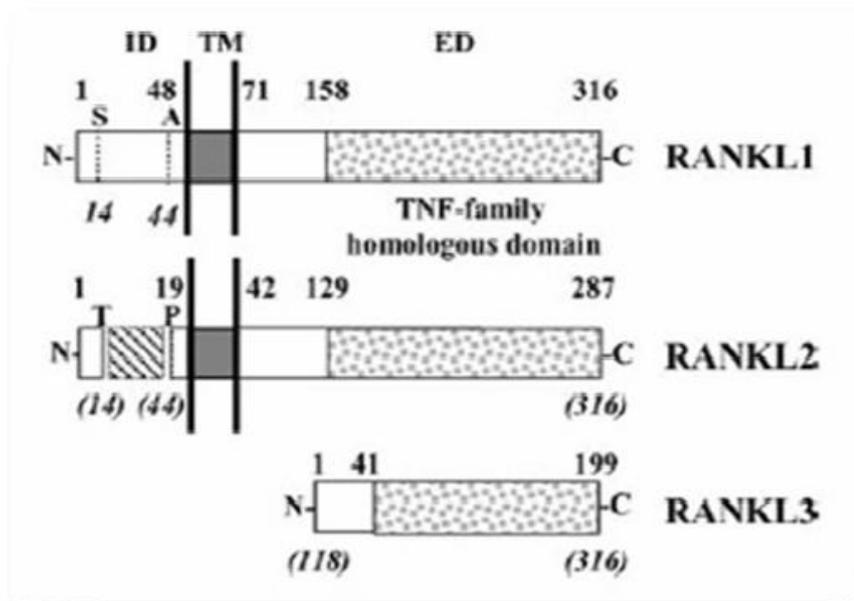


Figure 13: Structure de RANKL (1, 2). Trois isoformes de RANKL ont été mises en évidence chez l'Homme et la souris, deux formes transmembranaires et une forme soluble. La forme soluble peut être également produite par coupure protéolytique. RANK-L de souris (mRANK-L) et RANK-L humain (hRANK-L). IC : 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 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, délétée 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 Disintegrin And Metalloprotease 10), ADAM-17, la MMP-7 (Matrix Metalloproteinase 7), la MMP-14 (189-191). Le rôle exact de ces trois isoformes est très mal connu mais, en fonction de la nature de leur multimérisation, ces isoformes réguleraient l'ostéoclastogénèse (188). Par ailleurs, les isoformes membranaires de RANKL contrôlent la biodisponibilité de l'OPG en régulant sa dégradation par le lysosome et le protéasome (192).

b) Sources :

RANKL est exprimé par un grand nombre de cellules et de tissus, mais plus fortement par le squelette (os, moelle osseuse, cartilage) (149, 186), les organes lymphoïdes (ganglions, thymus, rate, foie foetal) et par le système vasculaire (158). 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 (193). RANKL est également exprimé en grande quantité par les lymphocytes T, les cellules endothéliales et les glandes mammaires (194, 195). Enfin, une expression faible de RANKL a été mise en évidence dans le cerveau, le coeur, les poumons, les reins et le placenta (193).

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 (1). 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 (161, 196-198). A l'opposé, il est inhibé notamment par le TGF- β et l'IL-13 (196).

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 préostéoclastes (149) induit en présence de M-CSF (85) leur différenciation en ostéoclastes matures (186). RANK-L est en outre un facteur de survie des ostéoclastes matures (187, 199). 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'ostéoclastogénèse, induisant une augmentation de la densité minérale osseuse et une hématopoïèse compensatoire extramédullaire (200). A l'inverse, après injection de RANKL, des souris naïves ont développé une ostéoporose importante (159).

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 (201). D'autre part, les exemples de pathologies faisant intervenir cette ostéoimmunologie ne manquent pas (ostéoporose, arthrite rhumatoïde, maladie périodontale...) (202). 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 (200). 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) (168, 191).

Rôle pro-tumoral de RANKL

Enfin, certaines cellules cancéreuses expriment une forme fonctionnelle du récepteur RANK donnant à RANKL une implication pro-tumorale (203, 204). RANKL intervient également dans les processus métastatiques des cancers du sein, de la prostate, du rein et de la thyroïde (160, 205-208). Il facilite la migration de cellules cancéreuses à l'origine de leur dissémination dans l'organisme (208).

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(187).

a) Structure :

RANK est une protéine transmembranaire de type I (partie N-terminale extracellulaire), de 616 acides aminés (90kDa) possédant un peptide signal (194). RANK se présente à la membrane sous forme d'un récepteur trimérique (Fig. 14). Le domaine extracellulaire de RANK contient 4 motifs riches en cystéine et deux sites de Nglycosylation (159). Une forme soluble a été détectée dans des surnageants de culture d'ostéoclastes après activation par RANKL mais son rôle exact reste indéterminé (209).

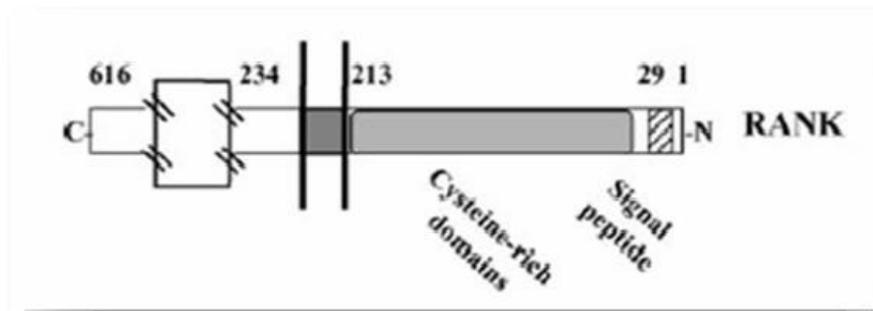


Figure 14 : Structure de RANK (1, 2). RANK est un récepteur transmembranaire existant également sous une forme soluble dont la fonction est mal connue.

b) Sources

RANK, récepteur de RANKL, est présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques et des ostéoclastes matures au niveau osseux. Il est également exprimé par les lymphocytes, les cellules dendritiques, 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 (166, 194, 210).

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 (1).

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 (211). 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 (98, 210). Les souris déficientes 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 (211) 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'ostéoclastogénèse et de la résorption osseuse (98). 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 15 (ci-dessous) résume les actions de la triade OPG/RANK/RANKL dans les systèmes ostéoarticulaire, immunitaire et vasculaire.

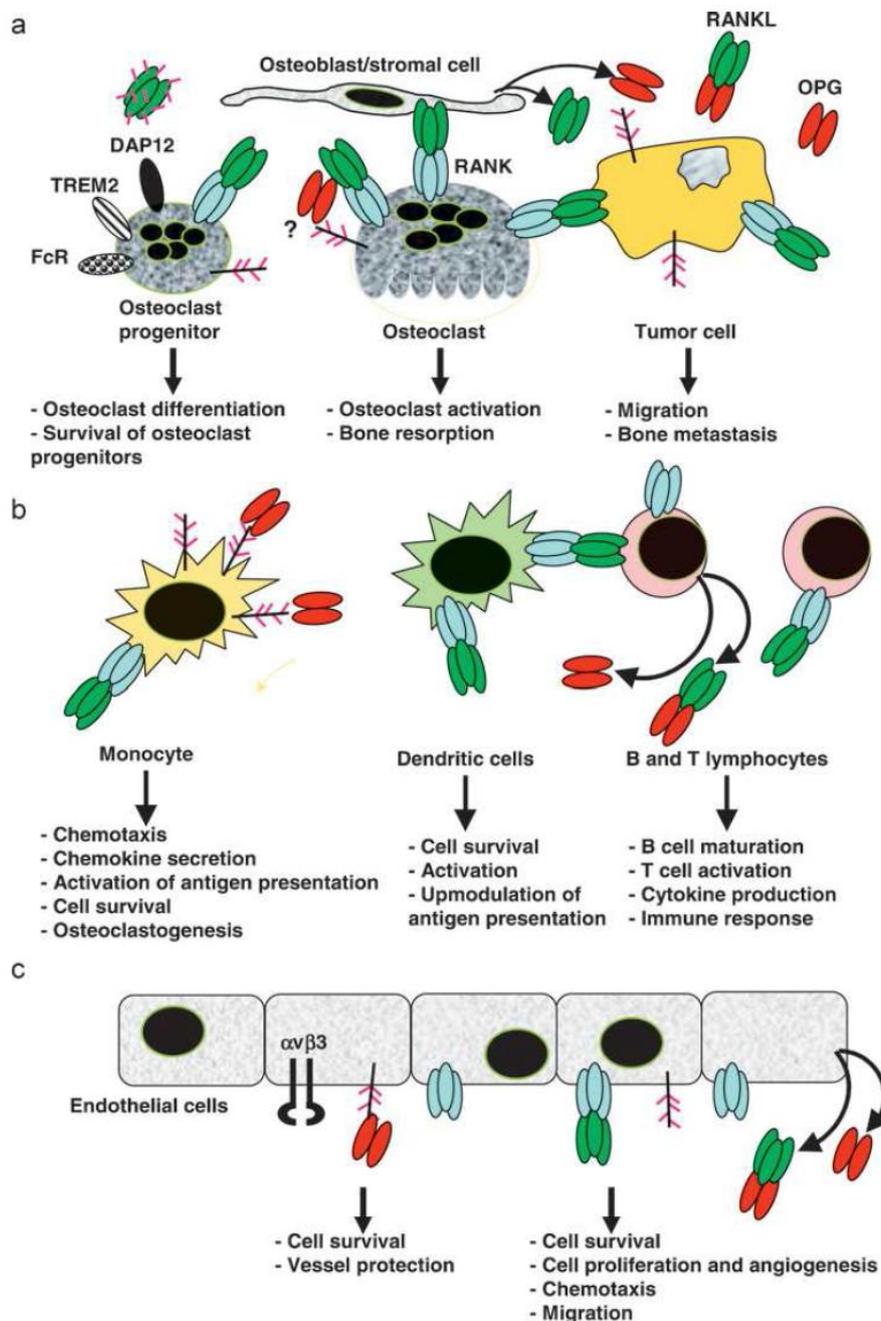


Figure 15: Actions de la triade OPG/RANK/RANKL, triade moléculaire clé de l'ostéoinnervation et des pathologies vasculaires (11). a) OPG/RANK/RANKL participe au remodelage osseux; b) OPG/RANK/RANKL module le système immunitaire via les monocytes, cellules dendritiques et les lymphocytes B et T; c) OPG/RANK/RANKL intervient dans le système immunitaire via la cellule endothéliale et la cellule musculaire lisse.

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 (116). 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 (170). 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 (158), bien qu'une faible expression de RANKL ait été observée dans des lésions aortiques humaines (212) ou dans des vaisseaux de métaphyse de souris (186). 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 (158, 213). RANKL sur-exprimé à la surface de ces cellules est fonctionnel, puisqu'il induit la différenciation ostéoclastique de précurseurs monocytiques (158). 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 (214, 215). 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 (177, 178). TRAIL réduit également l'expression d'OPG par les cellules stromales (216). De plus, l'OPG assure la migration et la prolifération des cellules endothéliales par une voie dépendante des intégrines α V β 3 et α V β 5 (174). Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, RANKL est également capable d'induire la survie des cellules endothéliales. Dans des cellules HUVEC soumises à une privation de sérum ou à un traitement par TNF- α , RANKL prévient partiellement la mort des cellules endothéliales *via* la stimulation de la voie PI3K/Akt (217). 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 (218). L'OPG en stimulant les précurseurs endothéliaux favorise l'angiogenèse (172). 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.

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 (116), 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 (169). 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 (219). 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 (220). 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 (221). OPG et RANKL jouent également un rôle dans la stabilité de la plaque d'athérome (12). En contexte inflammatoire, les cellules endothéliales sécrètent des quantités plus importantes d'OPG, ce qui induit l'expression de molécules d'adhésion à leur surface et augmente la fixation des monocytes et lymphocytes et leur migration en position sous-intimale. Ces cellules sécrètent du RANKL qui agit sur les CML de la paroi artérielle. La baisse du ratio OPG/ RANKL induirait une augmentation de l'expression des MMP et de leur activité. Ceci provoquerait une diminution de l'épaisseur de la chape fibreuse et favoriserait la formation de thrombus (Fig. 16). L'ensemble de ces résultats montrent l'implication des cytokines RANKL et OPG dans la survenue des calcifications artérielles.

Role Of OPG/RANKL In ATHEROSCLEROSIS & PLAQUE STABILITY

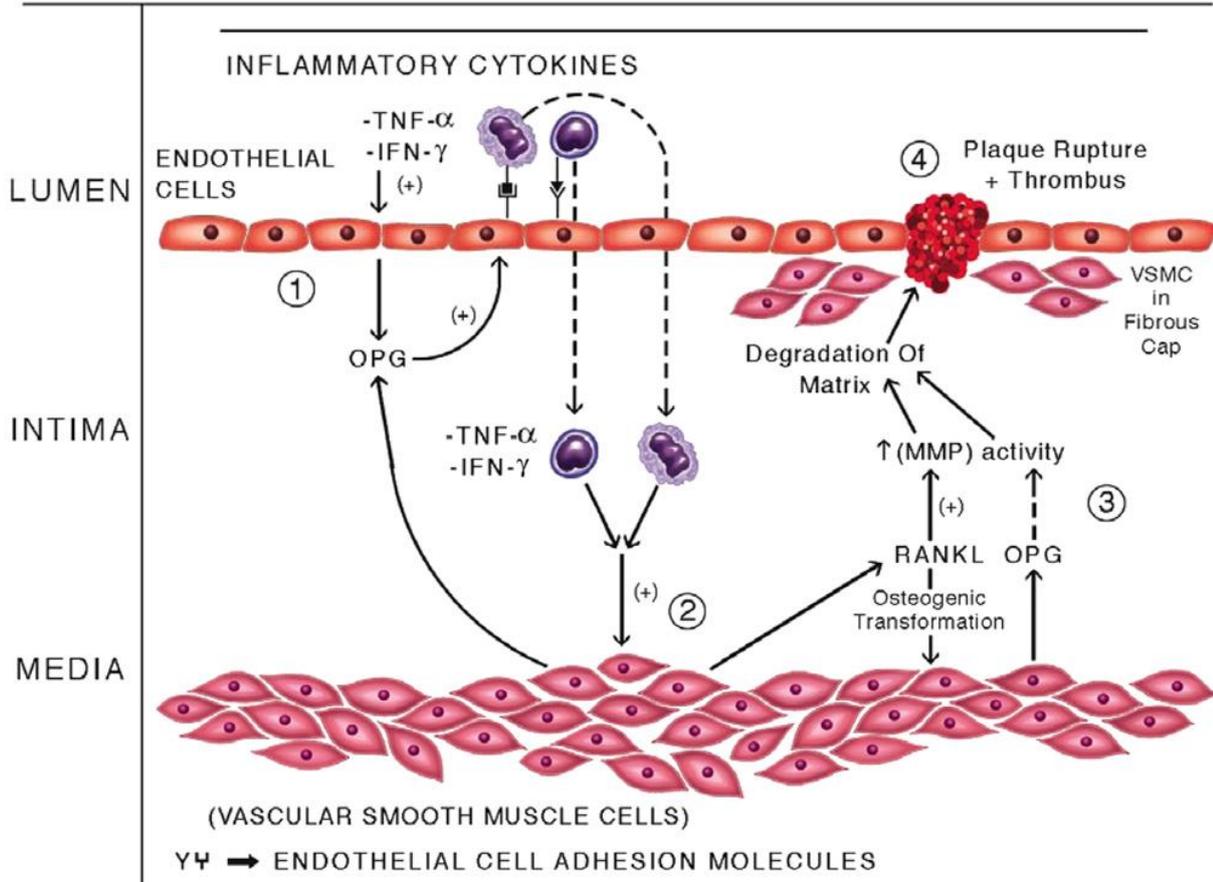


Figure 16 : Rôle d'OPG et RANKL dans l'athérosclérose et la stabilité de la plaque (12) : 1) En présence de cytokines proinflammatoires, l'expression d'OPG par les cellules endothéliales augmente, ce qui augmente l'expression de molécules d'adhésion à leur surface et la fixation des monocytes et lymphocytes et leur migration en position sous-intimale. 2) Ces cellules inflammatoires sécrètent du RANKL qui agit sur les CML de la paroi artérielle. 3) La baisse du ratio OPG/ RANKL induirait une augmentation de l'expression des MMP et de leur activité. 4) Ceci provoquerait une dégradation de la matrice extra-cellulaire et une diminution de l'épaisseur de la chape fibreuse, ce qui favorise la formation de thrombus.

Péricytes: rappels et implications potentielles des péricytes dans la formation et la régulation des calcifications artérielles

Rappels sur les péricytes

Histoire

La découverte des péricytes est attribuée à Rouget en 1873 qui a décrit à l'époque des cellules péri-endothéliales présentant des propriétés contractiles au niveau des vaisseaux de petit calibre (222). Auparavant, en 1871, Eberth décrivait des cellules similaires et en 1923 Zimmermann a étudié de manière détaillée les cellules dites "cellules de Rouget" qui furent finalement appelées péricytes en raison de leur localisation au pourtour des cellules endothéliales (223).

Origine

Les péricytes sont habituellement considérés comme d'origine mésenchymateuse mais ils peuvent avoir de multiples origines selon le territoire artériel. Pour les vaisseaux axiaux, ils dérivent du mésoderme (224, 225) et pour les vaisseaux coronaires ils proviennent du mésoderme splanchnique. La crête neurale fournit une gaine faite de péricytes et de cellules musculaires lisses présentes autour de chaque vaisseau dérivé de l'arche aortique. La couche endothéliale est, quant à elle, issue du mésoderme (226).

Caractéristiques et localisation

Les péricytes présentent des similitudes avec les cellules musculaires lisses de par leurs propriétés contractiles, et avec les fibroblastes de par leurs propriétés synthétiques (227, 228). En culture, les péricytes sont de larges cellules étoilées à bords réguliers. Au cours de leur croissance et lorsqu'elles arrivent à confluence, elles ont tendance à se rétracter les unes sur les autres et à former des nodules brunâtres (10, 229) (Fig. 17). Des cellules différentes des cellules musculaires lisses ont été identifiées dans des travaux plus anciens. Elles étaient considérées comme des fibroblastes intimaux ou des cellules mésenchymateuses de réserve (228) ou encore comme des péricytes. Les péricytes sont présents dans les microvaisseaux, entourant les cellules endothéliales des capillaires, des artérioles pré-capillaires et des veinules post-capillaires (227, 230). Les péricytes ont été principalement étudiés pour leur localisation au niveau des microvaisseaux mais ils sont en réalité présents dans la paroi artérielle des vaisseaux de petit, moyen et gros calibres où ils forment un réseau continu subendothélial (231). Ils sont aussi retrouvés dans les autres couches des vaisseaux c'est-à-dire dans la partie externe de la media, et dans les vasa vasora de l'adventice (231). Des cellules 3G5⁺ ont été identifiées dans les néovaisseaux de la média à proximité de lésions athérosclérotiques (232). Les péricytes sont considérés comme ayant une origine commune avec les CML mais présentent des différences de morphologie, fonction et localisation. Autour des cellules endothéliales, ils entretiennent une relation étroite avec ces dernières en partageant la même membrane basale dont ils contribuent à la synthèse et en échangeant des jonctions intercellulaires avec les cellules endothéliales

(4) (Fig. 18). Les péricytes sont potentiellement impliqués dans la coordination de la réponse des différentes cellules environnantes (CML, CE, monocytes-macrophages) en conditions pathologiques. Il existe d'importantes variations de ratio péricytes/cellules endothéliales selon les territoires artériels. Ainsi, le ratio est de 1:100 dans le muscle strié et de 1:1 dans la rétine et le système nerveux central, où cette densité correspond au rôle clé joué par les péricytes dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique (223). Une présence moins abondante correspond vraisemblablement aux besoins d'échanges gazeux et de nutriments plus importants de certains tissus comme le poumon ou le rein. Enfin la morphologie, les fonctions et les marqueurs des péricytes diffèrent selon les tissus. Ces marqueurs évoluent également en fonction des conditions environnementales et de l'état d'activation des péricytes, rendant leur identification précise délicate.

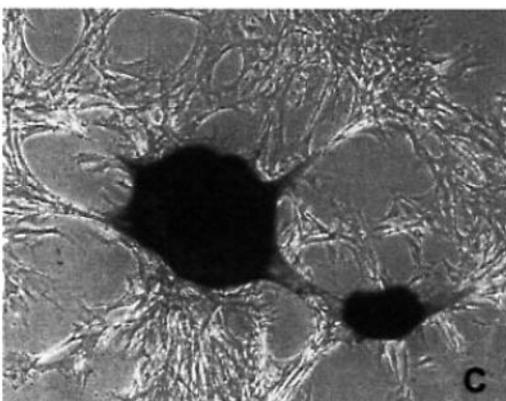
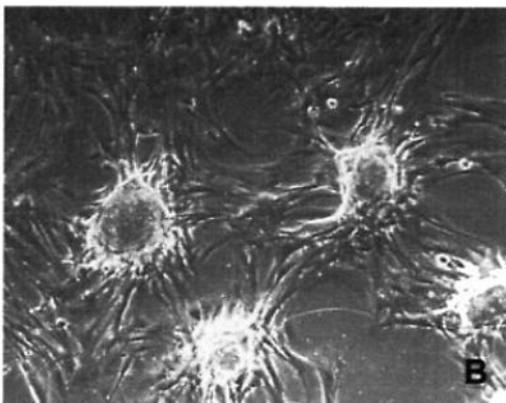
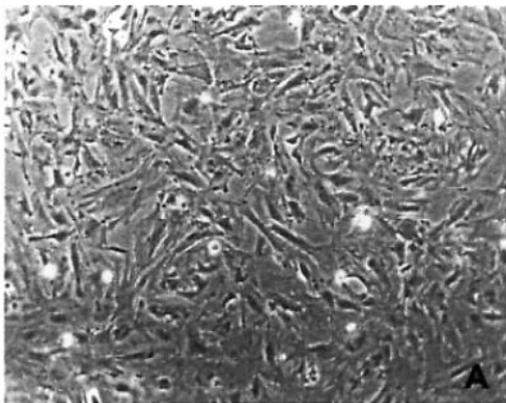


Figure 17: Péricytes en culture (10). A) Photographie au microscope en contraste de phase montrant la forme étoilée et les contours réguliers des péricytes. B) A l'état de post-confluence, les péricytes forment de larges nodules multicellulaires. C) Ces nodules sont marqués positivement par la coloration de Von Kossa.

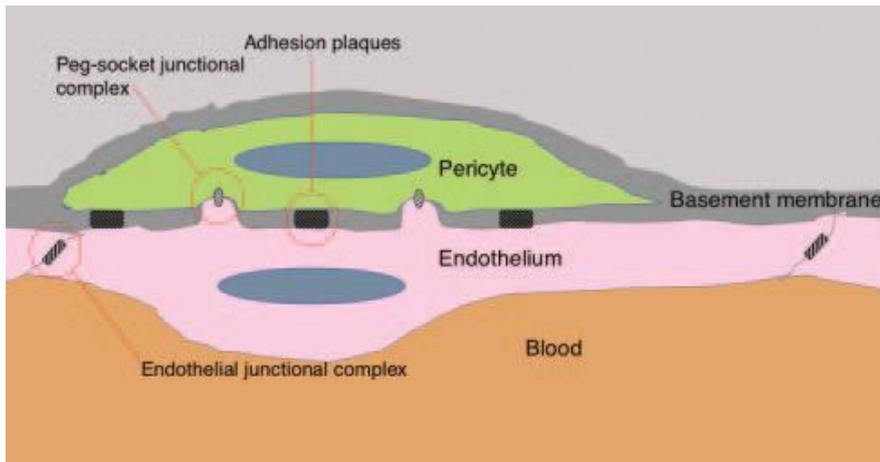


Figure 18: Interactions entre péricytes et cellules endothéliales (4). Les péricytes entourent les cellules endothéliales dont ils partagent la membrane basale. Des contacts directs péricytes-cellules endothéliales via des complexes jonctionnels comprenant des jonctions de type “peg-socket”

Marqueurs

Une des principales difficultés de l'étude des péricytes est leur identification avec certitude. Ils partagent des marqueurs communs avec les cellules musculaires lisses: ils expriment l'alpha-smooth muscle actin et le marqueur nestine (224). Les marqueurs habituellement employés sont NG2, 3G5, CD146, PDGFR-beta, SMA, RGS5 (4, 233-235). NG2 semble être particulièrement présent sur les péricytes activés en conditions pathologiques (en particulier stress inflammatoires) (236). Les péricytes microvasculaires sont généralement identifiés par la présence d'alpha-smooth muscle actin à leur surface, de l'antigène 3G5, et par l'absence de réactivité avec le facteur von Willebrand (vWF) (228, 237). En culture, une fois à confluence, ils ont été décrits comme exprimant le marqueur STRO-1 (229).

Implication potentielle des péricytes dans les calcifications artérielles

Minéralisation

Comme détaillé plus haut, le développement des calcifications artérielles présente des similitudes avec l'ossification physiologique. Dans l'os, il existe un couplage entre formation et résorption osseuse, orchestré par les ostéoclastes et les ostéoblastes. Dans la paroi artérielle, il est vraisemblable qu'un même phénomène existe impliquant l'existence de précurseurs cellulaires capables de réguler cette minéralisation. A l'état physiologique, un équilibre existe au sein de la paroi artérielle qui fait que le processus de minéralisation est constamment contenu. Une hypothèse est que des cellules de type ostéoclastes empêchent le dépôt de minéral (6). Les lésions ostéoïdes présentes dans certaines lésions d'athérome impliquent également l'existence de précurseurs de type ostéoblastes. Les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales sont les plus fréquemment étudiées mais les péricytes réunissent de nombreuses caractéristiques indispensables à la régulation des calcifications artérielles. Comme vu précédemment, les péricytes sont présents dans les différentes couches de la paroi artérielle

(231). Ils ont été identifiés dans les artères calcifiées (72), et des cellules 3G5⁺ ont été mises en évidence au voisinage des calcifications artérielles (87). Ils ont la capacité *in vivo* et *in vitro* de se différencier en cellules de type ostéoblastes et de minéraliser (229). Nous avons nous-même dans le cadre de ce travail observé des cellules CD146⁺ et NG2⁺ au sein de lésions athéromateuses humaines calcifiées carotidiennes et fémorales en immunohistochimie. De plus, les péricytes sont des cellules pluripotentes capables de se différencier en cellules de type ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes, cellules musculaires lisses, fibroblastes (238, 239). Les nodules formés par les péricytes en culture à l'état de post confluence ont des caractéristiques de tissu minéralisé (Fig. 17C) En effet, des études sur cellules d'aorte bovine ont montré que ces cellules formaient des nodules en culture et que ces nodules initiaient la minéralisation et étaient positifs pour MGP et BMP-2 (240). Les cellules extraites de ces nodules étaient positives pour les antigènes alpha actine, bêta-actine et 3G5. Proudfoot et *al.* ont également étudié ces nodules et observé que les cellules de ces nodules libéraient des corps apoptotiques qui initiaient des calcifications vasculaires à la manière des vésicules matricielles produites par les chondrocytes (241). Canfield et *al.* ont montré que les péricytes exprimaient les marqueurs caractéristiques de la différenciation ostéoblastique selon une séquence similaire à celle des ostéoblastes (238). Dans le même travail, les auteurs montraient, en utilisant des chambres de diffusion *in vivo*, que les péricytes formaient du tissu cartilagineux et osseux(238). Ces notions suggèrent que les péricytes présents dans la paroi artérielle sont capables d'initier la minéralisation.

Péricytes et angiogénèse

Les péricytes sont indispensables à la formation de vaisseaux sanguins matures (4, 233). Ils participent à la synthèse de la membrane basale et agissent en étroite association avec les cellules endothéliales pour maintenir l'intégrité des microvaisseaux et des vaisseaux de plus gros calibre (4). La dysfonction d'un type cellulaire ou de l'autre va avoir des conséquences sur la formation des vaisseaux. L'altération des péricytes peut entraîner des défauts sévères et des hémorragies au niveau de la barrière hémato-encéphalique (223). Lors du développement des tumeurs, le défaut de stabilité des vaisseaux trouve son origine en partie dans la dysfonction des péricytes et résulte en la formation de vaisseaux intratumoraux non fonctionnels, ce qui génère des hémorragies intratumorales. La couverture anormale de la couche endothéliale par les péricytes est un des mécanismes en cause comme cela a été observé chez les souris présentant une mutation du *s1p1* (*edg1*) (4). De manière similaire, l'angiogénèse intraplaque est un processus crucial dans la croissance des lésions et le caractère vulnérable de la plaque (242). Les néovaisseaux, en apportant des cellules et des cytokines inflammatoires, modifient le statut inflammatoire de la plaque, ce qui pourrait également contribuer à l'instabilité de la plaque (243). Les mécanismes précis sous-jacent à l'angiogénèse intraplaque et son influence sur la stabilité de la plaque restent largement à déterminer mais les péricytes présents dans les lésions d'athérosclérose ont été identifiés en association avec la présence des néovaisseaux (232,

244) et pourraient être impliqués dans la formation des néovaisseaux et dans les hémorragies intraplaques.

Péricytes et inflammation

L'athérosclérose est reconnue comme une maladie inflammatoire (245). Aux stades précoces du développement des lésions, les monocytes circulants s'ancrent, roulent (rolling) et adhèrent fortement à l'endothélium activé. Ce phénomène fait intervenir des molécules d'adhésion cellulaires (VCAM et ICAM) et leurs ligands sur les monocytes (LFA1). Puis, les monocytes migrent au sein des lésions précoces par diapédèse et deviennent des macrophages (8). L'accumulation intra-cellulaire de lipoprotéines, LDL-oxydés et cristaux de cholestérol par les macrophages ont divers effets biologiques: apoptose et effets anti- ou pro-inflammatoires (8) (Fig. 19). Ces étapes de l'athérogénèse sont bien décrites. En revanche, le devenir précis des macrophages dans les lésions reste incomplètement élucidé. Dans la circulation, il existe différents sous-types de monocytes: les monocytes activés selon la voie dite classique ou monocytes M1 ou inflammatoires (CD14⁺⁺, CD16⁻) et les monocytes activés selon la voie non classique ou monocytes M2 (CD14⁺, CD16⁺⁺). Les premiers, majoritaires (85% des monocytes circulants), infiltrent les lésions et deviennent les macrophages spumeux qui contribuent à la croissance du coeur nécrotique. Les seconds, minoritaires (15% des monocytes circulants), sont des monocytes qui assurent une veille permanente et dont le rôle reste encore à élucider. Dans les lésions athéroscléreuses, il existe également des sous-types de macrophages dont l'orientation phénotypique est un processus qui est critique pour l'évolution clinique des lésions. Les macrophages M1 ou CAM pour Classically Activated Macrophages sont considérés comme délétères pour les lésions car augmentant la caractère inflammatoire de la lésion et contribuant à la destabilisation de la plaque et à sa rupture. Les macrophages M2 ou AAM pour Alternatively Activated Macrophages auraient des propriétés anti-inflammatoires: production de TGF- β , sécrétion d'IL-10 et faible sécrétion d'IFN- γ , le tout réduisant le recrutement de cellules inflammatoires. Les AAM auraient également des capacités d'efférocytose consistant à nettoyer la plaque de débris cellulaires apoptotiques, ce qui limiterait la progression de la plaque. De ce point de vue, l'étude des péricytes présente un potentiel certain. En effet, dans un contexte d'inflammation chronique, il a été montré que les péricytes avaient la capacité d'interagir avec les monocytes-macrophages pour les reprogrammer et influencer leur migration spécifiquement vers les sites inflammatoires (236). Les auteurs de ce travail ont montré qu'après traitement par du TNF- α ou par des ligands des Pattern Recognition Receptor (PRR), les péricytes activés NG2⁺ exprimaient des quantités croissantes d' ICAM1. Les péricytes interagissaient ainsi avec les monocytes ayant migré depuis la circulation par contact cellulaire direct mais aussi de manière paracrine par sécrétion des chémoattractants tels CXC-chemokine ligand 1 (CXCL1), CXCL8, macrophage migration inhibitory factor (MIF), CC-chemokine ligand 2 (CCL2) et interleukin-6 (IL-6)(236). Cette synthèse aboutissait à une augmentation de la vitesse de migration des monocytes-macrophages vers les péricytes selon un

gradient positif. Par opposition, les monocytes-macrophages non “éduqués” par ces péricytes migraient de manière aléatoire dans les lésions et de manière moins efficace vers les sites inflammatoires. Ceci suggère que, par analogie, les péricytes présents au sein des lésions pourraient influencer sur la migration et l’orientation phénotypique des macrophages.

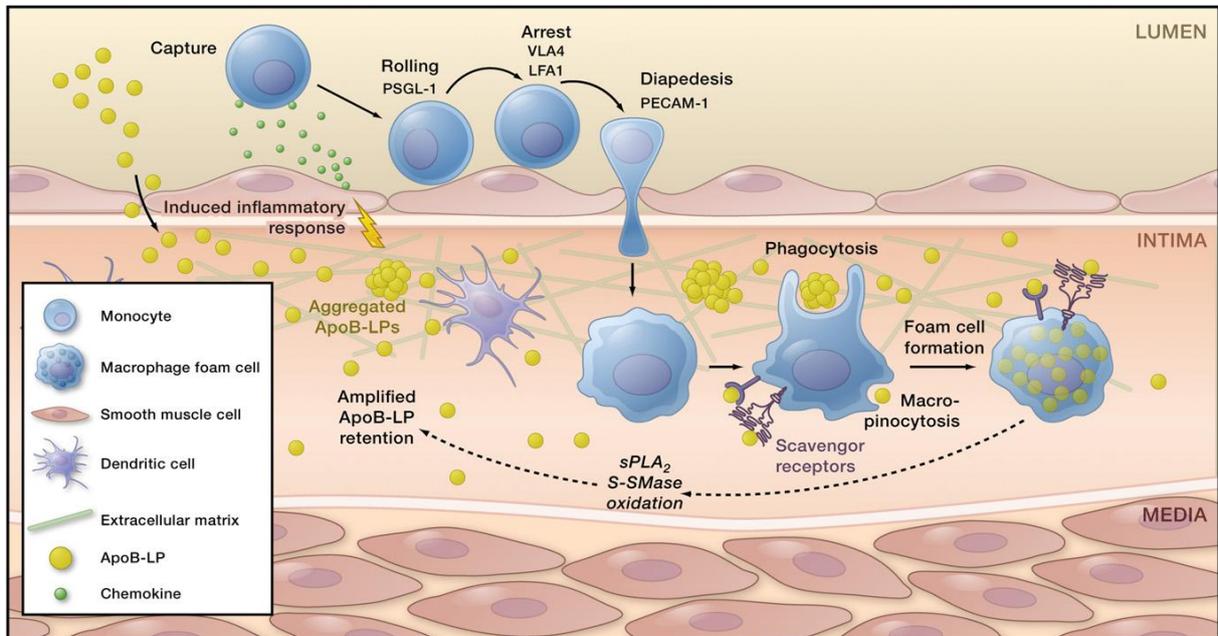


Figure 19: Recrutement des macrophages et formation des cellules spumeuses (8). Les apoprotéines B contenant des lipoprotéines (apoB-LPs) pénètrent dans l’intima, se lient aux protéoglycans et subissent diverses modifications, dont l’oxydation et l’hydrolyse par les phospholipases sécrétées A2 (sPLA2) et la sphingomyélinase sécrétée (S-SMase). Ces modifications induisent une réponse inflammatoire caractérisée par la sécrétion de chémokines et l’altération de l’expression des molécules d’adhésion par les cellules endothéliales. Ces modifications contribuent également à l’agrégation des lipoprotéines et favorisent la rétention des lipoprotéines. Les signaux inflammatoires conduisent au recrutement des monocytes dans l’intima où ils se différencient en macrophages et internalisent des lipoprotéines, aboutissant à la formation de cellules spumeuses. De plus, ces cellules spumeuses contribuent à amplifier les modifications et la rétention des lipoprotéines (flèche pointillée).

MATERIELS ET METHODES

Culture cellulaire

Les péricytes humains étaient issus de cultures primaires de cordons humains (Human Pericytes from Placenta, hPC-PL, cryopreserved cells, Promocell, référence C-12980). Leur culture se faisait dans du milieu péricytaire spécifique (Pericyte Growth Medium, ready-to-use, C-28040, Promocell).

Les CMLV humaines étaient obtenues à partir de cellules disponibles auprès des fournisseurs pour les cellules « saines » et à partir de plaques d'endartériectomies carotidiennes et fémorales de patients opérés dans le service de Chirurgie Vasculaire du CHU de Nantes pour les cellules « pathologiques ». Dans le deuxième cas, ces tissus sont considérés comme déchets opératoires en accord avec les lois françaises en matière d'éthique (L. 1211-3 à L.1211-9). La technique d'endartériectomie permettait de récupérer par définition la média de la zone pathologique sans l'adventice.

Les prélèvements étaient déposés dans une solution de PBS contenant des antibiotiques (pénicilline et streptomycine 1%) et conservés dans de la glace pour être acheminés en salle de culture où ils étaient traités immédiatement sous hotte à flux laminaire vertical [PSM Securiplus, Astec France]. Les prélèvements étaient découpés finement à l'aide d'une lame de bistouri selon une technique standard (246). On procédait ensuite à une digestion enzymatique (mélange de milieu avec collagénase-élastase et antibiotiques) en incubateur à 37°C durant 4 heures avec agitation douce. Puis les cellules étaient filtrées (filtre de 200µm), centrifugées et mises en culture dans un milieu spécifique (Smooth Muscle Cell Media 2, référence C-22062, avec supplement pack contenant du Fetal Calf Serum 0.05ml/ml, Epidermal Growth Factor 0.5ng/ml, Basic Fibroblast Growth Factor 2ng/ml, Insulin 5µg/ml, Promocell, pénicilline et streptomycine 1% ainsi que plasmocine et primocine).

Milieux conditionnés

Des monocytes sanguins (PBMCs) obtenus à partir de sang de donneurs sains étaient directement mis en culture dans du milieu constitué de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Biowhittaker, Verviers, Belgique) contenant 10-15% de serum de veau fœtal (SVF; Hyclone perbio, Logan, USA) et un mélange de pénicilline (100 U/mL) et streptomycine (100 U/mL) (Invitrogen). Après 24H de culture, les cellules étaient traitées avec soit du LPS (100ng/mL), soit de l'IL-6 (100ng/mL) ou du TNF-α (100ng/mL). Une partie des cellules étaient laissées dans le milieu standard. Après 24H, les cellules étaient lavées 3 fois dans du PBSx1 et placées dans du DMEM à 10% de SVF et laissées 12 à 24 heures. Le milieu était alors collecté et centrifugé (1500rpm-5min) pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant était stocké à -80°C avant usage. De plus, dans le cas d'une stimulation par le LPS, le milieu était incubé pendant 1 heure à 37°C en présence de polymyxine B afin de neutraliser le LPS résiduel avant mise en présence des péricytes ou CML.

Co-cultures

Les péricytes humains (2500 cellules/ puits) ou les CML (4000 cellules/ puits) étaient misss en plaque avec les PBMCs (8000 ou 12000 cellules/ puits, respectivement) dans des plaques 96 puits afin de réaliser des co-cultures directes. Après 2 jours de culture, les agents à tester étaient introduits. Par la suite, le milieu était changé tous les 3 jours. Des chambres de co-cultures ont également été utilisées. La chambre inférieure était remplie d'un milieu contenant une cytokine d'intérêt, à diverses concentrations, ou bien des péricytes étaientensemencés et cultivés jusqu'à confluence. Puis, la chambre supérieure était ajoutée, où l'on déposait des cellules CD14⁺. Afin d'étudier la migration, un gradient de SVF était créé (10% de SVF dans la chambre du bas et 1% dans celle du haut). Puis on étudiait la migration des CD14⁺ en faisant varier les paramètres suivants : concentration de cytokine (M-CSF entre 25 et 50ng/ml et OPG entre 10 et 100ng/ml) dans la chambre du bas, durée de co-culture (30min, 1H, 2H, 4H, 12H et 24H), densité des CD14⁺ dans la chambre du haut (1.10⁵ à 1.10⁶). Puis les cellules étaient fixées par du glutaraldéhyde 10% pendant 10min et les puits lavés à l'eau distillée. Les cellules restées à la partie supérieure de la membrane et n'ayant pas traversé les pores étaient éliminées à l'aide d'un coton-tige et une coloration au cristal violet 0.5% était réalisée pendant 10min. Après lavage, les membranes étaient retournées pour séchage sur la nuit. Le lendemain, des photos de la face inférieure de la membrane permettaient de mettre en évidence les cellules ayant migré. Ces dernières étaient systématiquement comptées.

Mesure de l'activité ALP

Les cellules étaient cultivées dans des plaques 96 ou 48 puits à 80% de confluence et traitées après 2 jours de culture avec ou sans agent. Les cellules étaient ensuite mises à incuber pendant la période indiquée et l'activité de l'ALP était mesurée selon la technique standard. L'activité de l'ALP était rapportée à la quantité totale de protéine (ou ADN selon kit) en utilisant le kit par ex Bio-Rad protein assay solution (Bio-Rad Laboratories).

Comptage

On réalisait une dilution au demi des cellules dans du bleu trypan. Ce colorant permet de distinguer les cellules mortes des vivantes en pénétrant à l'intérieur des cellules mortes qui apparaissent bleues alors que les cellules vivantes, expulsant activement le colorant, sont réfringentes. Une cellule de Malassez était utilisée pour le comptage, le volume de comptage était de 1µL. Pour obtenir le nombre total de cellules par mL on multipliait par 2 (dilution avec le bleu trypan) et par 1000 pour passer de 1 µL à 1 mL.

Test de minéralisation au rouge Alizarine

Afin de réaliser un test de minéralisation les cellules étaientensemencées dans des plaques 6, 24 ou 96 puits (respectivement 100 000, 20 000 et 3500 cellules par puits), avec, selon la manipulation envisagée, 2mL ou 500µL ou 100µL respectivement de DMEM supplémenté avec 10% de SVF et 1%

d'ATB. Au 4^e jour, le milieu était complétement avec de la Dexaméthasone (10^{-8} M) et de la Vitamine D3 (10^{-8} M). A J8, le milieu était changé et, en plus de la Dexaméthasone et de la Vitamine D3, de l'Acide Ascorbique (50 μ g/mL) et du β -Glycérophosphate (10mM) étaient ajoutés. Le milieu était ensuite changé à l'identique 2 fois par semaine pendant 2 semaines. Un contrôle négatif était gardé en culture sur la même plaque avec un milieu composé de DMEM supplémenté avec 10% de SVF et 1% d'ATB, changé lui aussi 2 fois par semaine.

Au bout de 21 à 28 jours de culture, les puits étaient rincés avec du PBS, les cellules étaient fixées avec de l'éthanol 70% froid pendant 60 minutes à 4°C. Après 3 nouveaux lavages avec de l'eau distillée, on ajoutait du rouge alizarine S (40mM ; pH=4,5; Sigma-Aldrich) pendant 10 minutes. Les puits étaient ensuite lavés avec de l'eau distillée à plusieurs reprises puis mis à sécher pendant plusieurs heures.

Les puits étaient photographiés sous loupe binoculaire (Zeiss, OberKochen, Allemagne). Une analyse d'image était alors réalisée grâce au logiciel Qwin (Leica, Le Pecq, France) afin de quantifier la minéralisation. Le résultat était exprimé en pourcentage de puits minéralisés et comparé au contrôle négatif.

Test de prolifération Alamar Blue

La prolifération a été évaluée à chaque étape par utilisation d'une réaction colorimétrique non cytotoxique par Alamar Blue (Invitrogen®).

PREMIERE PARTIE: Implication de l'ostéoprotégérine et des péricytes dans la formation de la métaplasie ostéoïde et la stabilité des plaques athéromateuses carotidiennes

Introduction

Comme détaillé dans l'introduction, les calcifications artérielles représentent un facteur de risque indépendant de morbi-mortalité cardiovasculaire (115), et leur développement influe fortement sur la stabilité des plaques d'athérome (247). La formation des calcifications artérielles répond à un processus finement régulé qui reproduit la formation du tissu osseux (72). La présence d'un véritable tissu osseux au sein de la paroi artérielle, appelé métaplasie ostéoïde (MO), comprenant des cellules de type ostéoblastes et de type ostéoclastes et même de la moelle osseuse, a été établie depuis longtemps (117, 125, 248). De même, la triade moléculaire OPG/RANK/RANKL, fondamentale dans l'homéostasie du tissu osseux, a été identifiée dans les lésions d'athérome (170). L'apparition et le développement des calcifications au sein des plaques d'athérome apparaissent fondamentaux en termes de symptomatologie de la plaque et de comportement clinique. En particulier, au niveau carotidien, la formation des calcifications artérielles peut modifier la stabilité de la plaque et influencer sur la survenue d'accidents vasculaires cérébraux (249, 250). La formation des calcifications artérielles est un phénomène complexe dont un des mécanismes est la différenciation ostéoblastique de précurseurs présents au sein de la paroi artérielle. La nature exacte des cellules à l'origine de cette différenciation est à ce jour non déterminée (251). Plusieurs travaux suggèrent que les péricytes présents au sein de la paroi artérielle jouent un rôle important dans la formation des calcifications artérielles et sont possiblement impliqués dans cette transdifférenciation (10, 231, 238). De même, l'ostéoprotégérine, par analogie au tissu osseux et en raison de sa présence et de son rôle au sein des lésions athéromateuses, représente un élément important pour la compréhension de la formation des calcifications artérielles ainsi qu'une potentielle cible thérapeutique.

A partir de l'étude d'une biocollezione de plaques athéromateuses carotidiennes, le but de ce travail a été de déterminer les différences en termes de calcifications qui existaient entre les lésions symptomatiques et asymptomatiques. L'hypothèse était que la formation de tissu osseux ou MO, influait sensiblement sur la stabilité et le comportement clinique des plaques carotidiennes. D'un point de vue mécanistique et par analogie au tissu osseux, la deuxième hypothèse que nous voulions vérifier était que les péricytes présents au sein de la paroi artérielle étaient impliqués dans la formation de ce tissu osseux ectopique et que l'ostéoprotégérine jouait un rôle régulateur dans ce phénomène.

Article 1

Osteoprotegerin, pericytes and bone-like vascular calcification are associated with carotid plaque stability

Short title : Osteoprotegerin and OM influence carotid plaque stability

Jean-Michel Davaine, MD^{1,2,3}, Thibaut Quillard, PhD¹, Régis Brion^{1,2,3}, Olivier Lapérine^{1,2,3}, , Béatrice Guyomarch^{3,4}, Thierry Merlini, MD^{1,2,3}, Mathias Chatelais^{1,2}, Florian Guilbaud^{1,2,3}, Meadhbh Áine Brennan, PhD^{1,2}, Céline Charrier^{1,2}, Dominique Heymann, PhD^{1,2,3}, Yann Gouëffic, MD, PhD^{3,4}, Marie-Françoise Heymann, MD, PhD^{1,2,3}.

1. INSERM, UMR 957, Nantes F-44035, France
2. Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Nantes F-44035, France
3. Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France
4. Institut du Thorax, Nantes, France

Word count : 4404

Key words: atherosclerosis, vascular calcification, carotid artery, stroke, osteoprotegerin, vascular pericytes, plaque stability, peripheral arterial disease

Total number of figures and Tables: 4 figures and 2 tables

Corresponding Author:

Dr Jean-Michel Davaine
Laboratoire Inserm U957, Faculté de Médecine
1 rue Gaston Veil
44000 Nantes, France
Tel: 33 (0) 240 412 845/ cell : +1301-221-9133
Fax : 33 (0) 240 412 860
E mail: davainej@yahoo.fr

Abstract (226 words)

Background and Purpose: Vascular calcification, recapitulating bone formation, has a profound impact on plaque stability. The aim of the present study was to determine the influence of bone-like vascular calcification (named osteoid metaplasia = OM) and of osteoprotegerin on plaque stability.

Methods: Tissue from carotid endarterectomies were analysed for the presence of calcification and signs of vulnerability according to AHA grading system. Osteoprotegerin (OPG), pericytes and endothelial cells were sought using immuno-histochemistry. Symptoms and preoperative imaging findings (CT-scan, MRI and Doppler-scan) were analyzed. Human pericytes were cultured to evaluate their ability to secrete OPG and to influence mineralization in the plaque.

Results: Seventy-three carotid plaques (49 asymptomatic and 24 symptomatic) were harvested. A significantly higher presence of OM (18.4% vs 0%, $p < 0.01$), OPG (10.2% of ROI vs 3.4% of ROI, $p < 0.05$) and pericytes (19% of ROI vs 3.8% of ROI, $p < 0.05$) were noted in asymptomatic compared to symptomatic plaques. Consistently, circulating OPG levels were higher in the plasma of asymptomatic patients (3.2ng/ mL vs 2.5ng/ mL, $p = 0.05$). *In vitro*, human vascular pericytes secreted considerable amounts of OPG and underwent osteoblastic differentiation. Pericytes also inhibited the osteoclastic differentiation of CD14+ cells through their secretion of OPG.

Conclusions: OPG (intraplaque and plasmatic) and OM are associated with carotid plaque stability. Pericytes may be involved in the secretion of intraplaque OPG and in the formation of OM.

Introduction

Arterial calcification (AC) is independently associated with increased cardiovascular morbidity and mortality (115), and its development in atheromatous lesions impacts deeply on plaque stability(252). AC is now reconized as a highly-regulated process which recapitulates bone tissue formation and homeostasis (90, 109, 250). Observation of bone-tissue, named osteoid metaplasia (OM) and even of bone marrow in vessels has been reported many years ago (248).Osteoblast-like cells have been identified in atheromatous lesions and while the exact nature of these cells remains to be fully determined, several lines of evidence support that pericytes are serious candidates(87, 231, 238). Also, giant multinucleated cells positive for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) have been identified in atherosclerosis lesions(253). They most likely originate from intraplaque macrophages, which have the ability to differentiate into osteoclast-like cells in the presence of RANK-Ligand(117). Comprehension of the mechanisms underlying the formation of mineralized tissue within carotid atherosclerosis lesions is of high importance since calcification greatly influences the plaque stability and the consecutive risk of stroke(249, 250, 252).

At the molecular level, the OPG- RANK- RANKL triad, fundamental in bone homeostasis is also present in atheroma lesions(254), further suggesting that atheromatous calcification micro-environment reproduce landmark characteristics of bone tissue. Osteoprotegerin has been positively associated with the severity of coronary artery disease and cardiovascular mortality in humans(255-257), but also with the severity of peripheral artery disease(258), symptomatic carotid lesions(259), and vulnerable carotid plaques(260). However, its exact clinical relevance regarding the development of OM and plaque stability in carotid lesions remains to be elucidated. Importantly, if well-defined characteristics of vulnerable carotid plaques are available (intraplaque hemorrhage, thin fibrous cap, large necrotic core)(261),their use in the context of preoperative patient risk-assessment is limited and clinically relevant markers of carotid plaque vulnerability are awaited with much anticipation.

The aim of the present study was to investigate the influence of OM on carotid plaque stability and to test the hypothesis that pericytes and OPG are determinant in this process.

Materials and Methods

Patients, biological samples and imaging data

From February 2008 to June 2010, atheromatous plaques were harvested from 73 patients undergoing carotid endarterectomy in our center. Patients presenting with non-atherosclerotic peripheral arterial disease, thrombosis and/or restenosis were excluded. Detailed demographic and clinical characteristics recorded were: age, sex, treatments, cardiovascular risk factors, medical history, and serum biochemistry analyses. All participating patients to the study gave a written informed consent. The clinical research protocol was approved by our institutional medical ethics committee (Nantes University Hospital Ethics Committee). Doppler-ultrasound (Doppler-us) examination associated with either angio-MRI or angio CT-scan were carried out to assess the characteristics of the lesions and intra-cerebral collaterality, as well as potential cerebral lesions. The results of these examinations were thoroughly reviewed by one of the author who was blinded to the symptomatic or asymptomatic status of corresponding patient. Based on the imaging findings, the calcic burden of the plaques was determined and plaques were categorized as highly calcified, moderately calcified, mildly calcified or non-calcified. Carotid plaques were considered as symptomatic when carotid stenosis $\geq 50-70\%$ was associated with the onset of ipsilateral transient ischemic attack or stroke or retinal ischemia and in the absence of other cause following extensive pre-operative workup. In this case, surgery associated with best medical treatment (antiplatelet agent, statin therapy and correction of cardiovascular risk factors) was indicated(262, 263). Surgery consisted of endarterectomy and was performed within 2-4 weeks of the

ischaemic event(264, 265). Indication for carotid endarterectomy for asymptomatic carotid lesions was stenosis $\geq 60-70\%$ according to NASCET criteria and with acceptable life expectancy(263-266).

Blood samples were collected in EDTA tubes 24h prior to surgery, and plasma was isolated by centrifugation, aliquoted and stored at -80°C until use.

OPG measurement

OPG levels were measured in plasma and cell culture supernatants by a validated enzyme immunoassay using commercially available matched antibodies (DY805 ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA). Osteoblastic pericyte-conditioned medium was obtained as follow: pericytes were cultured for 16 to 18 days in an osteoblastic-inducing medium. Then, cells were washed and a new medium, containing only 1% FCS, was used. After 48 hours the supernatant was harvested, centrifuged, aliquoted and stored at -80°C . Experiments were repeated three times in duplicate.

Histological and immunological analyses

Carotid plaques were removed by endarterectomy at the bifurcation from within the lumen as a single specimen. The atherosclerotic plaques were immersed in physiological serum, transferred to ice, and fixed in 10% formalin overnight, decalcified in Sakura TDE 30 fluid for 24h, and embedded in paraffin. Adjacent sections (5 μm thick, 20 sections per patient) were stained with (i) hematoxylin eosin (HE), (ii) masson trichrome, or incubated with monoclonal antibodies directed against (iii) CD31 (dilution 1/20, M823, Dako), (iv) NG2 (frozen sections, dilution 1/25, MAB2585, R&D Systems, Minneapolis, MN), (v) CD146 (dilution 1/200, AB75769, Abcam, Paris, France), (vi) smooth muscle actin (dilution 1/75, MAB1420, R&D Systems), and (vii) osteoprotegerin (dilution 1/25, AF805, R&D Systems). Plaques were analyzed for

the presence of calcification which were categorized in sheetlike calcifications, nodular calcifications, clear center calcifications and osteoid metaplasia, as previously described(73). The latter type consisted in typical mature bone with lamellar structure and in some cases bone-marrow. The sections were also examined separately by two authors, who were blinded to the status of the plaque, for the presence of signs of vulnerability according to Stary's classification (261): plaques with thick fibrous or fibrocalcic content covering central necrotic core were considered as stable (types IV, Vb and c) as opposed to unstable plaques that presented with thin or ruptured fibrous cap, large necrotic core (type IV and Va) or hemorrhage or ulceration (type VI). Imaging of the sections was obtained with the NanoZoomer device (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and staining quantification was carried out using Image J software (Image J, NIH, Bethesda, MD). Results were expressed as a percentage of region of interest (ROI).

Cell culture and differentiation assays

Reagents were purchased from Sigma (St Louis, MO), unless stated otherwise. Human placenta-derived pericytes (C12980) were grown in pericyte growth medium (C28040) (PromoCell, Heidelberg, Germany). The pericytes were subsequently placed for 18 days in an osteogenic culture medium containing vitamin D3 (10^{-8} M), dexamethasone (10^{-7} M), ascorbic acid (50 μ g/ml) and β -glycerophosphate (10 mM).

Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) from healthy donors(267) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 1ng/mL basic Fibroblast Growth Factor (bFGF; R&D systems), 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine. Adherent cells were

stored frozen at passage two after characterization by flow cytometry (CD45⁻, CD34⁻, CD105⁺, CD73⁺ and CD90⁺, purity \geq 99%). MSC were plated at a density of 10^4 cells/cm² in 96-well plates. On day 3 and until day 28, osteoblastic differentiation was realized and assessed using alizarin red staining(219).

CD14⁺ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy donors using Ficoll gradient and CD14 microbeads with MACS separators (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), checked by flow cytometry (CD14⁺, CD3⁻, purity \geq 95%), and stored frozen in liquid N₂ until use. CD14⁺ cells were grown in 96-well plates (35000 cells/well) using alpha-MEM (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FCS and 25ng/mL of recombinant macrophage colony stimulating factor (MCSF) (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Starting on day 3 and until day 14, the medium was supplemented with RANK-L (100 ng/mL), with or without 50-100 ng/mL of either recombinant TNF α or IL-6 (R&D Systems) and with 20% of pericyte-conditioned medium or control medium(219). On day 14, multinucleated cells were stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) using the Leukocyte Acid Phosphatase Assay kit, and images were analyzed on a D70 camera microscope (Olympus, Hamburg, Germany).(268) Neutralizing antibody directed against human OPG (TNFRSF11B antibody, R&D Systems) was used at a concentration of 0.7 μ g/mL, as required by the instructions provided.

Gene expression

Total RNA was extracted from the pericytes in a subset of wells using TriZol (Life Technologies, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed. The gene expression levels for osteoblastic markers, Runt-related transcription factor 2 (RunX2) (F-gtgcttagcgccatttca / R-ggctcttctactgagagtgaag), osteocalcin (F-

ggcgctacctgtatcaatgg/Rcagccaactcgtcacagtc) and alkaline phosphatase (ALP) (F-aacaccaccagggaac/Rgtcacaatgccacagatt) were assessed with real time PCR using SYBR green (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

Statistics

Throughout the manuscript, the data are presented as a mean \pm SEM, unless

Results

Osteoid Metaplasia is a specific feature of asymptomatic carotid plaques

Out of the 73 carotid plaques, OM (=bone-tissue) was noted in 18.4% (9/49) of the asymptomatic and in none (0/24, 0%) of the symptomatic carotid lesions ($p=0.02$) (Fig. 1A and Table 1). Analysis of imaging data showed that 62.5% of asymptomatic carotid plaques were highly or moderately calcified vs 8.4% of the symptomatic lesions ($p<0.001$) (Table 2).

stated otherwise. Statistical analyses were performed using SSPS 10.0 software. The data were compared either using the Chi-square test, or the two-sample Student's t-test, or a non parametric Mann and Whitney test when appropriate. A $p<0.05$ was considered statistically significant.

Osteoid Metaplasia is more frequent in histologically-assessed stable carotid plaques

Osteoid metaplasia was only observed in asymptomatic lesions. Vulnerability status of the plaques was determined based on the modified AHA classification(261). Symptomatic lesions had histological signs of vulnerability in 91.7% (22/24) of the cases. Asymptomatic lesions had no histological sign of vulnerability in 88.1% (37/42) of the cases. Consistently, OM was observed in only 7.4% (2/27) of the vulnerable plaques and in 17.9% (7/39) of the non-vulnerable plaques ($p=0.220$).

Figure 1

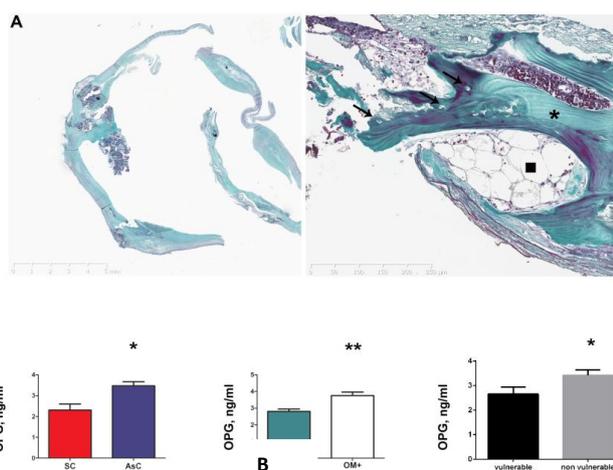


Figure 1:

(A) Representative sections of asymptomatic carotid plaque (left panel) with higher magnification showing dense lamellar structure (*), osteocytes (arrow), and even bone marrow (arrowhead) typical of osteoid metaplasia (right panel), Masson's Trichrome staining. (B) Patients presenting with asymptomatic plaques (AsC) had significantly higher OPG plasmatic levels than symptomatic patients (SC) (left panel). Similar result was observed when comparing OM+ and OM- groups (middle panel), and histologically-assessed vulnerable and non-vulnerable plaques (right panel), using Elisa assays.

Circulating OPG levels correlate positively with the asymptomatic nature of carotid plaques, the presence of OM and histologically-assessed plaque stability

The demographic and cardiovascular characteristics of the patients were compared. (Table S1 in File S1). Patients with asymptomatic carotid plaques had higher levels of LDL cholesterol (0.9 ± 0.3 g/L vs 0.7 ± 0.3 g/L, $p = 0.02$) and presented more frequently with associated peripheral arterial disease (PAD) (39% vs 19%, $p = 0.05$). Patients with symptomatic carotids were more frequently under 2 antiplatelet agent (50% vs 27%, $p = 0.05$). Levels of circulating OPG were found to be significantly higher in the plasma of patients presenting with asymptomatic carotid lesions compared to symptomatic carotid lesions (3.2 ± 1.5 ng/mL vs 2.5 ± 1.6 ng/mL, $p = 0.05$) (Fig. 1B and Table 1). Likewise, patients with OM in their plaques had significantly more OPG in their plasma compared to patients without (3.5 ± 1.2 ng/mL vs 2.3 ± 1.3 ng/mL, $p = 0.03$) (Fig. 1B). Finally and consistently, OPG levels ROI, $p < 0.001$) (Fig. 2B and Table 1). A subset of sections were stained for NG2 pericyte marker, confirming the results obtained with CD146. (Fig. 3).

A difference towards more CD31⁺ endothelial staining in asymptomatic lesions was noted but without reaching

were higher in the plasma of patients presenting with stable plaques compared to patients presenting with histological signs of plaque vulnerability (3.42 ± 0.22 ng/mL vs 2.66 ± 0.28 ng/mL, $p = 0.03$) (Fig. 1B).

Cellular OPG expression is higher in asymptomatic carotid plaques

In line with the plasmatic findings, asymptomatic carotid lesions contained significantly more OPG than symptomatic carotid lesions (10.3 ± 6.6 vs 3.4 ± 4.5 , % area staining, ROI $p < 0.001$) (Fig. 2A and Table 1).

Intense vascular pericyte presence accompanies calcified asymptomatic carotid lesions

As we hypothesized that pericytes could be involved in the onset of mineralized structure in these plaques and in the secretion of OPG, pericyte presence in the plaques was assessed. Importance of CD146⁺ pericyte staining was significantly higher in the asymptomatic carotid lesions compared to the symptomatic carotid lesions (6.4 ± 5.0 vs 2.3 ± 2.8 , % area staining, statistical significance (2.3 ± 4.1 vs 1.2 ± 1.4 % area staining, ROI, $p = 0.230$) (Fig. 3C and Table 1). Finally, analysis of smooth muscle actin staining showed no significant difference between the asymptomatic and symptomatic carotid lesions (Figure S1 in File S1).

Figure 2

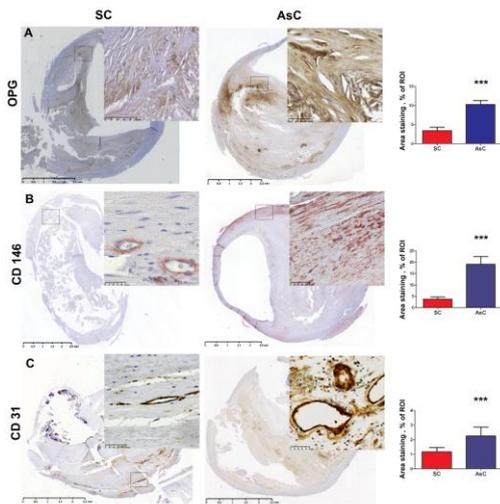


Figure 2:

Immunohistochemistry experiments were used to compare symptomatic carotid plaques (SC) and asymptomatic carotid plaques (AsC). Asymptomatic lesions presented higher OPG infiltration, $p < 0.001$ (A), higher CD146⁺ pericyte infiltration, $p < 0.001$ (B), and higher CD31⁺ endothelial cell infiltration, $p = 0.23$ (C). Representative images are on the left with corresponding quantification on the right.

Figure 3

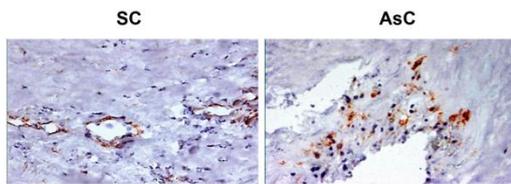


Figure 3 : NG2 staining was performed on a subset of lesions. The findings were similar to those obtained with CD146 : NG2 pericytes were found in a higher proportion in the asymptomatic (AsC) carotid lesions (right panel) than in the symptomatic (SC) carotid lesions (left panel).

Human pericytes differentiate into osteoblast-like cells and to mineralize *in vitro*

To further investigate if pericytes could be responsible for the intense mineralization and OPG secretion observed in asymptomatic carotid lesions, human primary pericytes (CD31⁻, CD146⁺ and NG2⁺, Figure S2 in File S1) were studied *in vitro*. Primary pericytes were able to mineralize when grown in osteogenic media (Fig. 4A). Simultaneously, PCR analysis showed that the expression of the osteoblastic differentiation markers alkaline phosphatase, RunX2, and osteocalcin were significantly increased

(ALP: 17.6-fold, $p < 0.0001$, RunX2: 9.1-fold, $p < 0.0001$, osteocalcin: 12.2-fold, $p < 0.0001$) (Fig. 4B). At baseline, human pericytes secreted elevated amount of OPG in comparison to smooth muscle cells and endothelial cells (Figure S3 in File S1). Pericyte-derived OPG secretion was significantly increased during their osteoblastic differentiation as well as under inflammatory stimulation (Fig. 4C).

Pericytes inhibit the RANKL-dependent differentiation of pre-osteoclasts into mature osteoclasts through expression of OPG

Macrophages, abundantly present in the atherosclerotic plaques represent a potential source of osteoclast-like cells in atheromatous calcified plaques. To understand the influence of pericytes on the mineralization balance within the plaque, we tested the effect of pericyte-conditioned medium on osteoclastogenesis. Pericytes were

cultured under osteoblastic conditions. After 16 to 18 days, we added fresh FCS-deprived culture medium for an additional 48 hours before collecting the supernatant. We observed that this osteoblastic pericyte-conditioned medium inhibited the RANKL-dependent differentiation of PBMC into osteoclasts, as shown by the significant reduction of TRAP-positive multinucleated cells *in vitro* (Fig. 4D). This phenomenon was still observed when inflammatory-conditioned pericyte supernatants (TNF α or IL6- pericyte-conditioned medium) were used (Fig. 4D). Since pericytes secreted increasing amounts of OPG when cultured in osteogenic medium as well as under TNF α and IL-6 stimulation (Fig. 4C), we tested the effect of a neutralizing monoclonal antibody directed against OPG and observed a significant reversion of this inhibiting effect (Fig. 4E).

Figure 4

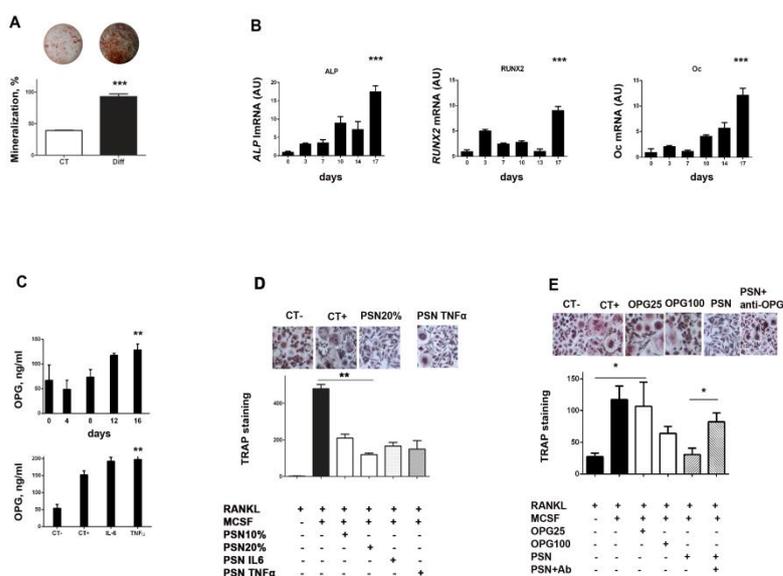


Figure 4:

(A) Human primary pericytes underwent osteoblastic differentiation when cultured in an osteogenic media, as shown by Alizarin red staining. Representative images are above corresponding bars. (B) PCR experiments confirmed that during this process, pericytes increasingly expressed the ALP ($p < 0.0001$), Runx2 ($p < 0.0001$) and osteocalcin (Oc) ($p < 0.0001$) characteristic markers of osteoblasts. (C) CD14+ cells were cultured during 14 days with standard media (CT-) or with addition of M-CSF and RANKL (CT+), after which TRAP staining was realized and giant multinucleated cells counted. Addition of pericytes supernatant (PSN) to the medium (in the proportion of 10% and 20%) dose-dependently inhibited the osteoclastic differentiation. A similar result was obtained when IL-6 and TNF- α pericyte-conditioned supernatant were used. Representative images are displayed above the bars. (D) Elisa experiments showed that pericytes expressed increasing amounts of OPG along their osteoblastic differentiation (upper graph) but also under inflammatory stimulation by IL-6 and TNF- α (lower graph). (E) CD14+ cells were cultured to undergo osteoclastic differentiation as in (C). Addition of OPG (25ng/ml and 100 ng/ml), inhibited the formation of multinucleated cells. Addition of PSN produced similar effect. Finally, addition of an antibody directed against OPG (PSN + anti-OPG) significantly reversed this inhibition.

All experiments were realized three times in triplicate. CT-: media with RANKL, CT+: media with RANKL and MCSF.

Discussion

OPG is a promising predictive marker for carotid plaque stability

The main finding of this study is the significant difference in terms of OPG profile, both plasmatic and intraplaque, between asymptomatic and symptomatic carotid plaques. Both OPG presence in the plaque and circulating OPG levels were found to be significantly higher in the asymptomatic compared to the symptomatic carotid lesions. OPG is an ubiquitous molecule, secreted by cells of the cardiovascular system (endothelial cells, smooth muscle cells, pericytes) but also by other tissues such as bone and the immune system(117, 148, 269). The circulating levels of OPG thus result from the activity of these various organs. However, here we observed that circulating OPG levels strictly mirrored intraplaque OPG presence and correlated positively with carotid plaque stability, suggesting that OPG plasmatic levels reflect the vulnerability of the carotid lesions. In contrast, imaging modalities could not accurately distinguish the symptomatic/ vulnerable plaques from the asymptomatic/ more stable plaques, confirming that no robust imaging markers for plaque vulnerability are currently available. As a result, plasmatic OPG should be seriously considered as an interesting potential marker for carotid plaque stability.

Osteoid Metaplasia is a critical feature of asymptomatic carotid lesions

The calcic composition of the plaque has a considerable impact on its clinical behavior (thrombosis, dissection, embolism) or on its clinical response to treatment (stent fracture, in-stent restenosis). A significant difference in terms of vascular calcification was observed between asymptomatic and symptomatic carotid plaques. Histological analyses and imaging findings showed that asymptomatic carotid lesions were significantly more calcified than

symptomatic carotid lesions. Interestingly, the main difference in terms of calcic pattern concerned OM, a highly-evolved bone-like type of vascular calcification, since almost 20% of the asymptomatic (versus none of the symptomatic) displayed OM. In a previous work, Hunt et al. made similar observation, showing that highly-calcified carotid lesions were less prone to induce stroke(250). Notably, they found a similar (13%) rate of bone formation in the most calcified lesions. Recent works have established the importance of microcalcifications in plaque stability(270, 271), strongly suggesting that the presence of microcalcifications in the thin fibrous cap covering atherosclerotic lesions increase the risk of rupture. This is consistent with the present results: microcalcification may destabilize the lesions by introducing a mismatch at the interface between soft and hard calcified tissue, while highly-evolved large calcification could ultimately stabilize the lesion. Consequently, OM should not only be considered as a marker for highly-evolved lesions, but also as a qualitative and informative marker for plaque vulnerability.

Development of OM in the plaques: the more OPG, the more bone?

The exact influence of OPG remains subject to controversy. The phenotype of OPG^{-/-} mice suggests a protective role against vascular calcification development(116). In contrast, OPG levels in humans correlate positively with the calcic burden of the plaque and the severity of the cardiovascular disease(256, 257). In bone tissue, OPG is secreted by osteoblasts and acts as a soluble decoy receptor for RANK-Ligand. As a result, osteoclast differentiation and activation and finally bone resorption are inhibited. Here, we consistently observed that asymptomatic carotid lesions, displaying OM, had the highest intraplaque OPG level. This high mineral presence within

the plaque may ultimately result in a more stable phenotype. Taken together, these results suggest that an intense secretion of OPG in carotid plaques promotes the development of OM, which in turn stabilizes the lesion, leading to the asymptomatic phenotype.

Previous works have shown different results(259, 272). Straface et al. suggested that high serum OPG levels might be associated with plaque instability, however, if the plaques were histologically-assessed regarding their vulnerability status, no information on the clinical symptoms of the patients were provided, limiting the clinical relevance of their conclusions. Similarly, Golledge et al. also observed elevated OPG levels in symptomatic carotid lesions, but no histological data regarding plaque vulnerability were provided. In contrast, we here provide both clinical and histological data of the carotid lesions as well as detailed imaging data analysis. The results consistently and strongly indicate that higher OPG plasma levels are to be found in patients with asymptomatic carotid lesions.

Implication of pericytes in the differential regulation of bone-like vascular calcification

It is now established that bone formation and arterial calcification share many similarities. In bone, OPG is secreted by osteoblasts and acts as a decoy receptor for RANKL. Osteoprotegerin prevents RANKL fixation on its receptor RANK at the surface of osteoclasts, resulting in the inhibition of osteoclast proliferation and differentiation. This process finely tunes bone formation and resorption(186). In the arterial wall, osteoblast precursors and the OPG/RANKL/RANK axis have clearly been identified(254). During arterial calcification formation, cells with osteochondrogenic potential differentiate along the osteoblastic lineage, yet the exact nature of these cells (smooth muscle

cells, endothelial cell, calcifying vascular cells, pericytes) remains to be elucidated(273). Vascular smooth muscle cells represent the most common cell type studied. They have been shown to have important phenotypic plasticity and when exposed to hydroxyapatite crystals, high concentrations of phosphate or inflammatory cytokines, vascular smooth muscle cells differentiate into osteoblastic cells(274). However, other cells including pericytes have also been previously shown to be involved in the vascular calcification process(87, 238) and their potential as mesenchymal precursors has recently been highlighted(275). Our immuno-histological results showed no difference in terms of smooth muscle cells and endothelial cells presence between symptomatic and asymptomatic plaques. In contrast, higher pericyte cell density was noted in asymptomatic lesions, suggesting that pericytes could be actively involved in plaque stability.

The most studied potential sources of OPG in the artery wall are endothelial cells and smooth muscle cells. Upon inflammatory stimulation, these cells release OPG in the surrounding extracellular matrix as well as in the circulation, which is one of the possible sources of circulating OPG in atherosclerotic patients (276). Based on *in vitro* preliminary results, we observed that unstimulated pericytes had an intense secretion of OPG at baseline in comparison to smooth muscle cells and endothelial cells (Figure S3 in File S1). Altogether, these notions led us to hypothesize that vascular pericytes could play a critical role in arterial calcification formation and regulation, similar to that of osteoblasts in bone tissue. To confirm this hypothesis, we first assessed the presence of pericytes in our cohort of carotid plaques. We observed CD146⁺ and NG2⁺ pericyte cell presence in the lesions but with a significantly more intense staining in the asymptomatic

carotid plaques. Of note, no significant difference was noted in terms of CD31⁺ endothelial staining nor in terms of actin staining, further suggesting that pericytes could be responsible for this difference (Fig. 2). Then, we assessed the osteoblastic potential of human primary pericytes *in vitro*. We showed that human pericytes were able to differentiate into osteoblast-like cells and to mineralize (Fig. 4A and 4B). Finally, we found that pericytes secreted increasing amounts of OPG during osteoblastic differentiation and upon inflammatory stimulation by IL-6 and TNF- α (Fig. 4D). In other words, pericytes, that have the ability to differentiate into osteoblasts and to secrete high amounts of OPG were found in a significantly higher proportion in the asymptomatic plaques that were precisely characterized by an intense presence of both pericyte cells, OPG, as well as a higher proportion of osteoid metaplasia.

As in bone tissue, it is hypothesized that in ectopic calcification, mineral deposition and resorption are two opposite processes tightly balanced and regulated by osteoblast- and osteoclast-like cells. Cells from the monocytic lineage are most likely the precursors of the giant multinucleated cells observed in atherosclerosis lesions(253). Following on with this hypothesis, we observed that pericytes supernatant inhibited the differentiation of Hu- CD14⁺ cells into osteoclasts, an effect that persisted under IL-6 and TNF- α inflammatory stimulation (Fig. 4C). Given the intense secretion of OPG by pericytes during osteoblastic differentiation and under inflammatory stimulation (Fig. 4D), we hypothesized that this inhibitory effect was OPG-mediated. Indeed, blockage of OPG using a neutralizing antibody proved efficient in significantly reversing this inhibition (Fig. 4E).

Altogether, these results suggest that pericytes are implicated in the

formation of vascular calcification. Resident vascular pericytes may have a protective effect against the development of vascular calcification by regulating the balance of mineral formation together with other cells such as monocytes/macrophages. Exposure to inflammatory atherosclerotic stress induces pericytes to (i) differentiate towards an osteoblastic lineage and (ii) secrete various mediators, including OPG, which trigger an imbalance between mineral formation and resorption in the plaque. As a result, intense calcification, and in some cases OM, develop within atherosclerotic lesions which ultimately may stabilize the plaque.

Study limitations and perspectives

Our results suggest that OPG is an interesting predictive marker for carotid plaque vulnerability in patients presenting with carotid artery stenosis, however the plasma evaluation is based on a the analysis of a single blood sample harvested the day before surgery. A clinical study comprising serial plasmatic OPG evaluations of symptomatic and asymptomatic patients is warranted to confirm the relevance of OPG as a predictive factor for carotid plaque stability in routine clinical practice.

The intense expression of OPG in asymptomatic carotid lesions is associated with the presence of OM. Whether OPG is secreted in response to atherosclerosis-related stress and fosters the development of bone-like vascular calcification or is secreted as a retaliatory metabolite that is finally overwhelmed is not clear and further studies are needed to address this aspect.

Finally, the presence of OM seems to be noted consistently and exclusively in the asymptomatic lesions, making OM an interesting qualitative marker for plaque composition. However, to our knowledge, no imaging modality can distinguish OM from other types of vascular calcification.

Conclusion

Our study shows that asymptomatic and symptomatic carotid lesions are completely opposed in terms of OPG and calcic patterns. Asymptomatic plaques are characterized by an intense mineralization with often the presence of OM, a high OPG and pericytes presence as well as elevated circulating OPG levels. These completely different profiles suggest that circulating OPG could be a useful plasmatic predictive factor for plaque vulnerability in clinical practice. Furthermore, our studies indicate that OPG and pericytes are governing factors in the development of arterial calcification.

Acknowledgments

We thank Carine Montagne and Annie Guillard for the management of the biocollection.

Supporting Information

File S1 containing Table S1 and Figures S1, S2 and S3.

Tables

Table 1: Comparison between asymptomatic and symptomatic carotid groups showed completely different calcic, OPG and CD146+ cells patterns. OM+:presence of osteoid metaplasia, OM-: absence of osteoid metaplasia

Carotids	SC	AsC	p-value
OM+,n (%)	0 (0%)	9 (18%)	0.02
OM-,n (%)	24 (100%)	40 (82%)	
Circulating OPG (ng/ml)			0.05
n	24	49	
mean±SD	2.5±1.6	3.2±1.5	
Intraplaque OPG (% ROI)			<0.001
n	23	39	
mean±SD	3.4±4.5	10.3±6.6	
Intraplaque CD146 (% ROI)			<0.001
n	23	47	
mean±SD	2.3±2.8	6.4±5.0	
Intraplaque CD31(% ROI)			0.230
n	23	46	
mean±SD	1.2±1.4	2.3±4.1	

Table 2: Characteristics of the lesions, clinical symptoms and imaging modalities. Degree of stenosis are reported according to NASCET criteria. Symptomatology is reported as transient ischemic attack (TIA) or stroke. Previous to surgery patients underwent Doppler-ultrasound (Doppler-us) in all cases and another imaging modality that was whether Magnetic Resonance Imaging (MRI) or Computerized Tomography Scanner (CT-scan)

	SC (24/24)	AsC (n=32/49)	p- value
Degree of stenosis			0.04
60-69, n(%)	2 (8.3%)	0 (0%)	
70-79, n(%)	8 (33.3%)	20 (62.5%)	
>80, n(%)	14 (58.3%)	12 (37.5%)	
TIA, n(%)	8 (33.3%)	-	-
Stroke, n(%)	15 (62.5%)	-	-
Preoperative imaging modalities			
Doppler US, n(%)	24 (100%)	32 (100%)	-
MRI, n(%)	13 (54.2%)	26 (81.3%)	0.06
CT-scan, n(%)	23(95.8%)	8 (25%)	<0.001
Calcification			0.001
Highly calcified, n(%)	1 (4.2%)	1 (3.1%)	
Moderate, n(%)	1 (4.2%)	19 (59.4%)	
Mild or none, n(%)	8 (37.4%)	6 (18.8%)	
NA, n(%)	13 (54.2%)	7 (18.7%)	

Supplementary Tables

Table S1: Demographic parameters, cardiovascular risk factors, cardiovascular co-morbidities and treatment of patients operated on for either symptomatic (SC) or asymptomatic (AsC) carotid artery stenosis.

	SC	Carotids AsC	Total	p-value SC vs AsC
Age				0.490
n	24	49	73	
mean±SD	71±9	69±11	70±11	
BMI				0.070
n	24	48	72	
mean±SD	24.6±3.6	26.6±4.7	25.9±4.4	
LDL (g/L)				0.020
n	23	44	67	
mean±SD	0.7±0.3	0.9±0.3	0.9±0.3	
HDL (g/L)				0.270
n	23	44	67	
mean±SD	0.5±0.2	0.6±0.2	0.5±0.2	
Female, n(%)	6 (25%)	14 (29%)	20 (27%)	0.75
Smoking, n(%)	10 (42%)	31 (63%)	41 (56%)	0.08
HTA, n(%)	18 (75%)	45 (92%)	63 (86%)	0.06
Diabetes mellitus, n(%)	2 (8%)	11 (22%)	13 (18%)	0.12
CAD, n(%)	12 (50%)	27 (55%)	39 (53%)	0.68
PAD, n(%)	4 (17%)	19 (39%)	23 (32%)	0.05
CVD, n(%)	24 (100%)	7(14%)	30 (41%)	<0.001
CEI, n(%)	6 (25%)	24 (49%)	30 (41%)	0.07
Sartan, n(%)	7(29%)	13 (27%)	20 (27%)	0.81
Statin, n(%)	21 (88%)	39 (80%)	60 (82%)	0.32
Fibrates, n(%)	1 (4%)	0 (0%)	1 (1%)	0.1
APA, n(%)	23 (96%)	48 (98%)	71 (97%)	0.55
Aspirin, n(%)	16 (67%)	33 (67%)	49 (67%)	0.95

Clopidogrel, n(%)	19 (79%)	27 (55%)	46 (63%)	0.04
2 APA, n(%)	12 (50%)	13 (27%)	25 (34%)	0.05
VKA, n(%)	0 (0%)	1 (2%)	1 (1%)	<0.0001

Supplementary Figures

Figure S1:

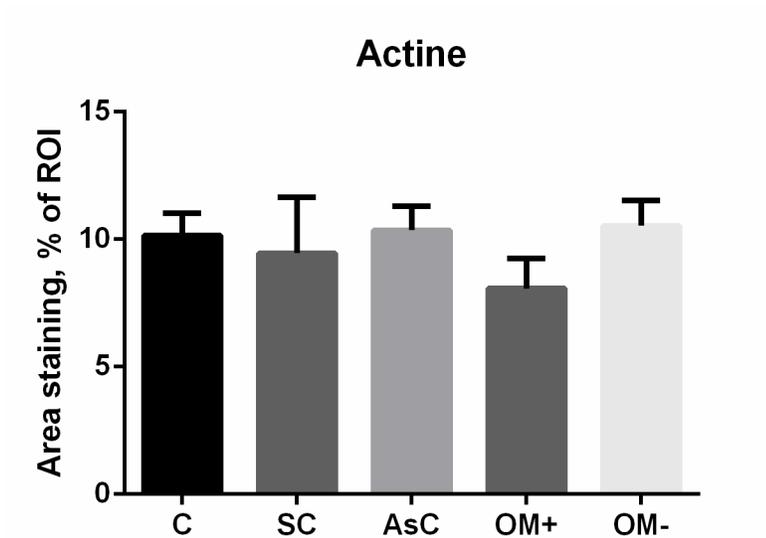


Figure S2 :

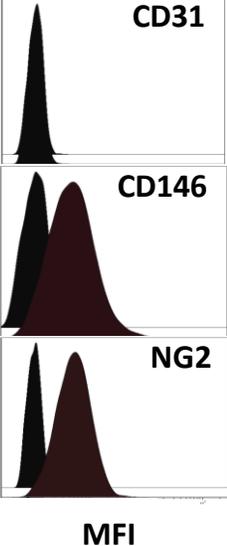
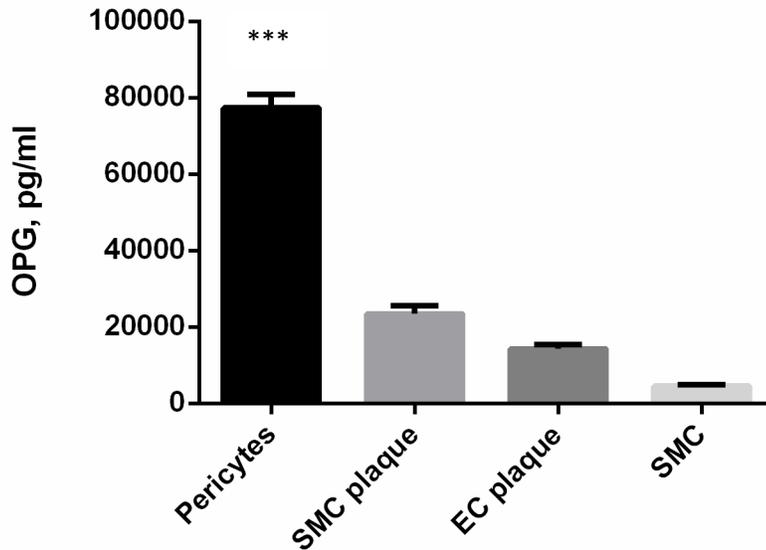


Figure S3:



Supporting Information Legends

Figure S1: Smooth muscle actin antibody staining showed no difference between the various groups of carotid (C), symptomatic (SC) and asymptomatic (AsC) carotid plaques and also between OM+ (presence of OM), OM- (absence of OM) lesions.

Figure S2: Human primary pericytes were characterized using flow cytometry analysis as CD31-, CD146+ and NG2+ cells, MFI : Mean Fluorescence Intensity.

Figure S3: Elisa experiments were performed on different cell types: human primary pericytes (Pericytes), smooth muscle cells and endothelial cells harvested from carotid plaques (SMC plaque and EC plaque, respectively), and smooth muscle cells harvested from cadaveric donors before multi-organ transplantation procedure (SMC). Cells were plated at the same density (70000cells/ well) in 6 well plates. After reaching confluence, cells were cultured for 48h with 1% FCS, after which the supernatants were centrifuged, aliquoted and stored at -20°C. *

DEUXIEME PARTIE : Formation des calcifications artérielles au sein des plaques athéromateuses fémorales; parallèle entre la formation de calcifications ectopiques et le métabolisme osseux

Introduction

Les calcifications artérielles (CA) sont observées dans la majorité des plaques athéromateuses et leur prévalence augmente nettement avec l'âge, le diabète et l'insuffisance rénale. Les CA constituent un facteur de risque indépendant de morbi-mortalité cardiovasculaire (115). Les calcifications intimaux représentent une étape précoce dans le développement des lésions athéromateuses, sous forme de microcalcifications. Ces dernières, lorsqu'elles se développent dans la chape fibreuse de la plaque, peuvent fortement modifier le comportement mécanique des lésions et favoriser le risque de rupture de plaque (277, 278). Les conséquences cliniques des ruptures de plaques peuvent être extrêmement sévères et aboutir selon le territoire à un infarctus du myocarde, un AVC, une ischémie digestive ou une ischémie aiguë de membre inférieur. A l'inverse, la présence massive de CA évoluées au sein d'une lésion pourrait avoir un effet stabilisateur (250). Les conséquences cliniques des CA ont été évoquées dans l'Introduction et de nouveaux outils thérapeutiques sont désormais attendus. Nous avons également précédemment détaillé que les CA étaient la résultante de mécanismes actifs, similaires à ceux impliqués dans l'ossification. La nature des cellules à l'origine de la formation des précurseurs ostéoblastiques dans la paroi artérielle reste à déterminer. Outre les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, largement étudiées, les péricytes possèdent toutes les caractéristiques (pluripotence, implication dans l'angiogénèse, capacité d'instruction et d'interaction avec les monocytes et les neutrophiles) nécessaires à leur implication dans la formation et la régulation des CA (10, 112).

La plupart des données disponibles caractérisant la formation de tissu ostéoïde portent sur le territoire coronaire et peu de données sont disponibles en ce qui concerne les territoires artériels périphériques. Or la composition des plaques d'athérome, en particulier leur composante calcique, et l'évolution clinique des lésions diffèrent fortement d'un territoire à l'autre (279). Il apparaît donc indispensable d'étudier et de caractériser les différents territoires artériels périphériques. Nous avons récemment montré que le développement de calcifications artérielles évoluées, de type MO, se produisait au niveau carotidien et que ce type de calcification était associé au caractère asymptomatique des plaques. D'un point de vue mécanistique, ces travaux suggéraient que les cellules de type péricytes et que la triade OPG/RANKL/RANK étaient impliquées dans la formation de MO au niveau carotidien.

L'objectif de cette deuxième partie est double. Il s'agit d'une part de caractériser la formation et le type des calcifications artérielles au niveau fémoral, et en particulier d'étudier la survenue de MO. D'autre part il s'agit de tester l'implication des péricytes et de la triade OPG/RANKL/RANK dans ce processus de minéralisation.

Article 2 (Soumis, Atherosclerosis)

Bone-like tissue arterial calcification in femoral atherosclerotic lesions: prevalence and role of osteoprotegerin and pericytes. Insights from the ECLA study.

Jean-Michel Davaine, MD^{1,2,3}, Thibaut Quillard, PhD¹, Mathias Chatelais^{1,2}, Florian Guilbaud^{1,2,3}, Régis Brion^{1,2,3}, Béatrice Guyomarch^{3,4}, , Meadhbh Áine Brennan, PhD^{1,2}, Céline Charrier^{1,2}, Dominique Heymann, PhD^{1,2,3}, Yann Gouëffic, MD, PhD^{3,4}, Marie-Françoise Heymann, MD, PhD^{1,2,3}.

1. INSERM, UMR 957, Nantes F-44035, France
2. Université de Nantes, Nantes atlantique universités, Nantes F-44035, France
3. Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France
4. Institut du Thorax, Nantes, France

Word count : 4404

Key words: atherosclerosis, vascular calcification, carotid artery, stroke, osteoprotegerin, vascular pericytes, plaque stability, peripheral arterial disease

Corresponding Author:

Dr Jean-Michel Davaine

Laboratoire Inserm U957, Faculté de Médecine

1 rue Gaston Veil

44000 Nantes, France

Tel: 33 (0) 240 412 845/ cell : +1301-221-9133

Fax : 33 (0) 240 412 860

E mail: davainej@yahoo.fr

Introduction

Arterial calcification prevalence within atherosclerotic lesions have been reported to be higher than 80% and they have been identified as an independent risk factor of cardiovascular mortality (115). Arterial calcification impacts greatly on plaque stability. Microcalcification, an early feature of atherosclerotic lesions, have been identified in the fibrous cap covering the necrotic core where they critically modify plaque stability and increase the risk of rupture (277, 278). Conversely, lesions with a high calcific burden are suspected to be more stable (250). Besides its effect on plaque stability, arterial calcification can jeopardize the success of vascular surgery as well as endovascular procedures. Deciphering the mechanisms underlying arterial calcification formation is thus a priority.

It is now well-recognized that arterial calcification results from a highly-regulated process recapitulating bone tissue-formation. Bone-like tissue, namely osteoid metaplasia (OM), has previously been observed in atheroma lesions (73). Likewise, osteoblast-, osteocalcin-like cells and the major bone-regulatory cytokines have been identified in atherosclerotic lesions (72). However, the great majority of the studies focus on coronary arteries and aorta and few if any studies provide detailed

description of OM lesions in the femoral territory. Moreover, the exact nature of cell precursors responsible for the onset of arterial calcification remains to be determined. Smooth muscle cells are the most frequently studied cells in this perspective (95), but macrophages (277) and pericytes (10, 240) role in this process have also been recognized. In particular, pericytes are mesenchymal precursors present in the arterial wall and have been suspected to be directly involved in arterial calcification development (229). At the molecular level, the OPG-RANKL-RANK triad, supporting bone remodeling, is also involved in arterial calcification formation. Osteoprotegerin has been shown to be associated with coronary arterial calcification and coronary arterial disease severity, cardiovascular mortality and peripheral arterial disease (12). We recently observed that OM in carotid lesions was associated with the asymptomatic nature of the plaques and provided evidence supporting the involvement of pericytes and of OPG in this process. We also found that plasmatic OPG levels were significantly higher in asymptomatic patients.

The aim of this study is to characterize the formation of OM at the femoral level and to test the implication of pericyte cells and the OPG-RANK-RANKL triad in this process.

Methods

Patients, biological samples and imaging data

From February 2008 to June 2009, atheromatous plaques were harvested from 43 patients undergoing femoral endarterectomy in our center. Patients

presenting with non-atherosclerotic peripheral arterial disease, thrombosis and/or restenosis were excluded. Detailed demographic and clinical characteristics recorded were: age, sex, treatments, cardiovascular risk factors, medical history, and serum biochemistry analyses. All

participating patients to the study gave a written informed consent. The clinical research protocol was approved by our institutional medical ethics committee (Nantes University Hospital Ethics Committee). Doppler-ultrasound (Doppler-us) examination associated with either angio-MRI or angio CT-scan were carried out to assess the characteristics of the lesions and inflow as well as outflow vascular characteristics and collaterality. Surgery associated with best medical treatment (antiplatelet agent, statin therapy and correction of cardiovascular risk factors). Surgery consisted of surgical endarterectomy. Blood samples were collected in EDTA tubes 24h prior to surgery, and plasma was isolated by centrifugation, aliquoted and stored at -80°C until use.

OPG measurement

OPG levels were measured in plasma and cell culture supernatants by a validated enzyme immunoassay using commercially available matched antibodies (DY805 ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA). Osteoblastic pericyte-conditioned medium was obtained as follow: pericytes were cultured for 16 to 18 days in an osteoblastic-inducing medium. Then, cells were washed and a new medium, containing only 1% FCS, was used. After 48 hours the supernatant was harvested, centrifuged, aliquoted and stored at -80°C. Experiments were repeated three times in duplicate.

Histological and immunological analyses

Femoral plaques were removed by endarterectomy at the bifurcation from within the lumen as a single specimen. The atherosclerotic plaques were immersed in physiological serum, transferred to ice, and fixed in 10% formalin overnight, decalcified in Sakura TDE 30 fluid for 24h, and

embedded in paraffin. Adjacent sections (5µm thick, 20 sections per patient) were stained with (i) hematoxylin eosin (HE), (ii) masson trichrome, or incubated with monoclonal antibodies directed against (iii) CD31 (dilution 1/20, M823, Dako), (iv) NG2 (frozen sections, dilution 1/25, MAB2585, R&D Systems, Minneapolis, MN), (v) CD146 (dilution 1/200, AB75769, Abcam, Paris, France), (vi) smooth muscle actin (dilution 1/75, MAB1420, R&D Systems), and (vii) osteoprotegerin (dilution 1/25, AF805, R&D Systems). Plaques were analyzed for the presence of calcification which were categorized in sheetlike calcifications, nodular calcifications, clear center calcifications and osteoid metaplasia, as previously described(73). The latter type consisted in typical mature bone with lamellar structure and in some cases bone-marrow. The sections were also examined separately by two authors, who were blinded to the status of the plaque, for the presence of signs of vulnerability according to Stary's classification (261): plaques with thick fibrous or fibrocalcic content covering central necrotic core were considered as stable (types IV, Vb and c) as opposed to unstable plaques that presented with thin or ruptured fibrous cap, large necrotic core (type IV and Va) or hemorrhage or ulceration (type VI).

Imaging of the sections was obtained with the NanoZoomer device (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and staining quantification was carried out using Image J software (Image J, NIH, Bethesda, MD). Results were expressed as a percentage of region of interest (ROI).

Cell culture and differentiation assays

Reagents were purchased from Sigma (St Louis, MO), unless stated otherwise. Human placenta-derived pericytes (C12980) were grown in pericyte growth medium

(C28040) (PromoCell, Heidelberg, Germany). The pericytes were subsequently placed for 18 days in an osteogenic culture medium containing vitamin D3 (10^{-8} M), dexamethasone (10^{-7} M), ascorbic acid (50 μ g/ml) and β -glycerophosphate (10 mM). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) from healthy donors(267) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 1ng/mL basic Fibroblast Growth Factor (bFGF; R&D systems), 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine. Adherent cells were stored frozen at passage two after characterization by flow cytometry (CD45⁻, CD34⁻, CD105⁺, CD73⁺ and CD90⁺, purity \geq 99%). MSC were plated at a density of 10^4 cells/cm² in 96-well plates. On day 3 and until day 28, osteoblastic differentiation was realized and assessed using alizarin red staining(219). CD14⁺ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy donors using Ficoll gradient and CD14 microbeads with MACS separators (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), checked by flow cytometry (CD14⁺, CD3⁻, purity \geq 95%), and stored frozen in liquid N₂ until use. CD14⁺ cells were grown in 96-well plates (35000 cells/well) using alpha-MEM (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FCS and 25ng/mL of recombinant macrophage colony stimulating factor (MCSF) (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Starting on day 3 and until day 14, the medium was supplemented with RANK-L (100 ng/mL), with or without 50-100 ng/mL of either recombinant TNF α or IL-6 (R&D Systems) and with 20% of pericyte-

conditioned medium or control medium(219). On day 14, multinucleated cells were stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) using the Leukocyte Acid Phosphatase Assay kit, and images were analyzed on a D70 camera microscope (Olympus, Hamburg, Germany).(268) Neutralizing antibody directed against human OPG (TNFRSF11B antibody, R&D Systems) was used at a concentration of 0.7 μ g/mL, as required by the instructions provided.

Gene expression

Total RNA was extracted from the pericytes in a subset of wells using TriZol (Life Technologies, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed. The gene expression levels for osteoblastic markers, Runt-related transcription factor 2 (RunX2) (F-gtgctaggcgcatttca/Rcgctcttctactgagagtggag), osteocalcin (F-ggcgctacctgtatcaatgg/Rcagccaactcgtcacagtc) and alkaline phosphatase (ALP) (F-aacaccaccagggaac/Rgtcacaatgccacagatt) were assessed with real time PCR using SYBR green (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

Statistics

Throughout the manuscript, the data are presented as a mean \pm SEM, unless stated otherwise. Statistical analyses were performed using SSPS 10.0 software. The data were compared either using the Chi-square test, or the two-sample Student's t-test, or a non parametric Mann and Whitney test when appropriate. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Typical bone-tissue, named Osteoid Metaplasia (OM), is present in the majority of advanced atheromatous femoral plaques

Between February 2008 and June 2009, 43 femoral plaques were harvested. Histological analysis revealed the presence of a typical bone-tissue within the plaque in 65% (28/43) of the cases (Fig. 1A). This osteoid metaplasia featured a dense extracellular matrix made of collagen wherein osteocyte cells were embedded. In the immediate vicinity was also noted lipidic and vascular structure similar to bone

marrow. In 17/28 (60.7%) of the plaques, giant multinucleated cells could be clearly identified in the surrounding of the OM (Fig. 1B). Tartrate Resistant Alkaline Phosphatase staining was realized and TRAP+ cells were noted in x% of the OM+ plaques (Fig. 1C).

Of note, no significant difference was noted between between the groups of patients with or without OM in their plaques in terms of demographic characteristics, cardiovascular risk factors, cardiovascular co-morbidities, cardiovascular treatment nor in terms of phospho-calcic metabolism blood markers (Table 1).

Figure 1

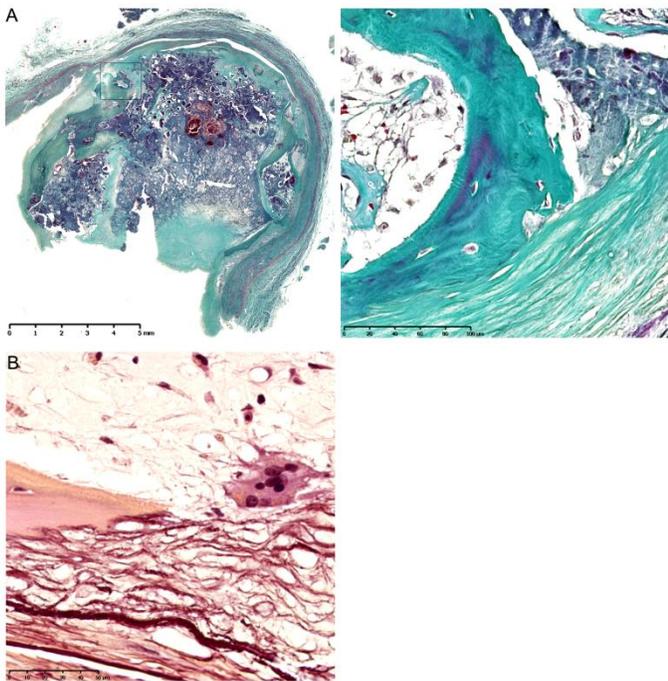


Figure 1: A) Femoral lesion (upper left) and magnification (upper right) of an area of osteoid metaplasia with osteocytes (arrow) embedded in a dense collagen matrix (arrowhead) and surrounding bone marrow structure (*), Masson's Trichrome. B) Giant multinucleated cell in the vicinity of osteoid metaplasia, HES.

Figure 2

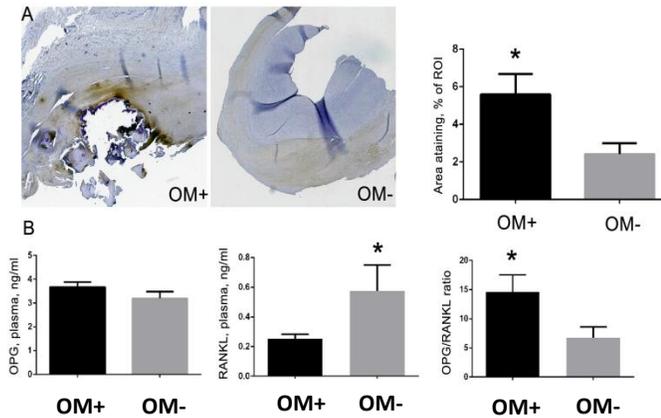


Figure 2: A) Representative pictures of OPG immune-histochemical staining of plaques with (OM+) and without (OM-) osteoid metaplasia (left) with corresponding quantification (right) B) Elisa experiments showed that patients presenting with OM in their lesions had significantly lower RANKL and higher OPG/RANKL ratio than patients without OM in their lesions. No significant difference was noted in terms of OPG plasma levels between the two groups of lesions

Osteoprotegerin presence is positively associated with OM in the femoral plaques

The OPG-RANK-RANKL triad supports bone remodeling in both physiological and pathological situations. We previously found that OPG presence was significantly higher in carotid lesions that displayed OM compared to carotid lesions without OM. We here also noted a more intense OPG expression in the OM+ than in the OM- femoral plaques (P=0.036) (Fig. 2A). **Presence of pericyte cells within femoral atheromatous**

Calcified atheromatous plaques contain osteoblast- and osteoclast-like cells, yet the exact nature of these cells remains to be

determined. We realized a group of immunohisto-chemical staining to identify the cellular population present in the OM+ and OM- femoral plaques. We did not find any difference in terms of smooth muscle-actin⁺ cells (smooth muscle cells) (11.0±1.6 in OM+ and 15.3±1.7 in OM-, % area staining, ROI, p=0.100) (Fig. 3A), nor in terms of CD31⁺ cells (endothelial cells) (1.5±0.2 in OM+ and 1.5±0.4 in OM-, % area staining, ROI, p=0.971) (Fig. 3B). There were more CD146⁺ cells (pericytes) in OM+ than in OM- lesions, however this difference did not reach statistical significance (7.2±1.5 in OM+ and 3.7±0.9 in OM-, % area staining, ROI, p=0.108) (Fig. 3C). Finally, no difference was noted in

terms of CD68⁺ cells (macrophages) (2.7±0.3 in OM+ and 2.4±0.5 in OM-, % area staining, ROI, p=0.589) (Fig. 3D).

Figure 3

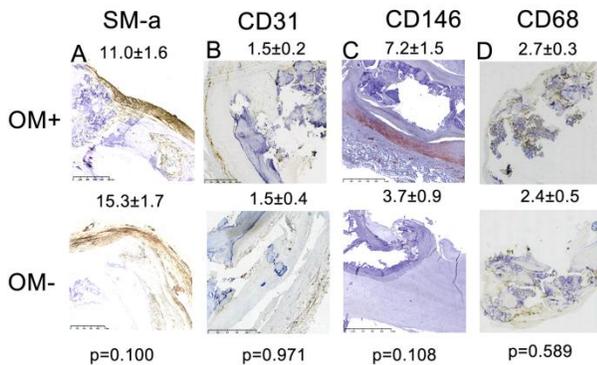


Figure 3: Immunohistochemical experiments with staining quantification showed no difference in terms of presence of SM-a⁺, CD31⁺, CD146⁺, CD68⁺ cells between the lesions with or without osteoid metaplasia.

Pericytes and OPG as major cellular and molecular actors in the arterial calcification process

Femoral plaques with OM contained significantly more OPG and also more pericyte cells, however this latter difference was not significant. In a similar study at the carotid level, we showed that carotid plaques containing OM were characterized by significantly higher OPG and pericytes presence compared to plaques without OM, and that pericytes and OPG were most likely involved in the formation of OM. As a consequence, we tested here this hypothesis at the femoral level. OPG elisa assays were performed on pericyte

supernatant as well as on smooth muscle cells and endothelial cells supernatants. Pericyte cells secreted significantly higher amount of OPG than smooth muscle cells and endothelial cells (p=0.03), (Fig. 4A). Then, to figure out if pericytes present in the arterial wall could influence the osteochondrogenic differentiation of surrounding cells, we tested the effect of pericyte supernatant on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (Hu-MSC). We observed that pericyte supernatant had a significant and dose-dependent inhibiting effect on the Hu-MSC osteogenic differentiation. Interestingly, this inhibiting effect was abolished when supernatant was obtained from TNF- α and IL-6 stimulated pericytes (Fig. 4B).

Figure 4

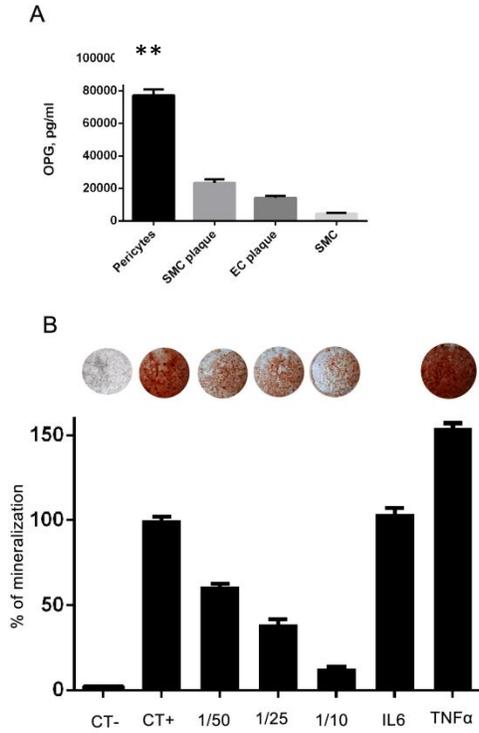


Figure 4: A) Pericytes supernatant (Pericytes) contained significantly more OPG than smooth muscle cells and endothelial cells obtained from endarterectomies (SMC and EC plaques) and from cadaveric donor in the setting of multi-organ transplant procedure (SMC), B) Pericyte supernatant dose-dependently inhibited the osteogenic differentiation of Hu-MSC. This effect was abolished when supernatant was obtained after inflammatory stimulation of pericytes by IL-6 and TNF α

CT-: Hu-MSC cultured in standard medium; CT+: Addition of the differentiation factors (Vit D, dexamethason, ascorbic acid, beta-glycerophosphate); 1/50: Addition of pericytes supernatant in the proportion of 1/50, 1/25, 1/10 to the medium

Discussion

Femoral lesions have higher prevalence of OM than other vascular territories- new data and clinical implication

This studies showed that femoral atherosclerotic lesions are frequently (65% of the cases here) the site of ectopic bone formation, named OM. OM displays all the characteristic of a fully mature bone tissue, with osteoblasts, osteocytes embedded in a dense extracellular matrix made of collagen, giant multinucleated TRAP⁺ osteoclast-like cells and even fatty and vascular structures similar to bone marrow. These results are highly indicative that mechanisms recapitulating chondro-osseous and membranous ossification are responsible for the development of ectopic calcification as well. The presence of bone tissue within the arterial wall has already been established in previous reports (248). However, available data relate OM prevalence within the range of 15-20%. Consistently, in a similar work based on carotid lesions, we observed OM in 18% of the cases. The majority of the studies focus on coronaries, carotid arteries or aorta. Precise data regarding other peripheral vascular beds are scarce. To the best of our knowledge, this is the first prospective cohort of femoral endarterectomies studying thoroughly the presence of OM. Out of the 43 lesions analyzed, 28 of them (65%), presented OM, suggesting a higher frequency of OM in this particular vascular bed. These results also strengthen the concept of arterial heterogeneity : lesions are widely different according to vascular beds and and the calcic content seems to be one of the determinant factor underlying this heterogeneity (198, 279). Studies based on imaging data analysis showed that ilio-femoral arteries were more calcified than other vascular beds (67), however no

histological analysis was conducted. The presence of OM, a particularly evolved form of arterial calcification could be responsible for this difference and could be held accountable, at least in part, for the difference in terms of outcome and response to treatment between femoral and other vascular beds. In other words, OM could have a strong clinical impact. Supporting this theory, we recently showed at the carotid level that the presence of OM was positively and significantly associated with the asymptomatic nature of the carotid plaques and also with the stability status of the plaques according to AHA classification. One can hardly compare patients with carotid and femoral lesions. Surgical indications are different and it is likely that femoral lesions represent a subset of more evolved lesions compared to carotid. Moreover, femoral lesions are not classified according to their stability status. Nonetheless, it is most likely that OM has its own clinical impact at the femoral level. Arterial calcification are known to influence the risk of stent fracture following stent implantation (146) and in-stent restenosis rates are different (and higher) in the femoral arteries compared to other vascular beds (280). The composition of the plaque, and in particular its calcic content, may be instrumental from this point of view. Our results suggest that OM is a critical determinant of the femoral plaque composition and clinical studies should be conducted to assess the exact influence of arterial calcification on in-stent restenosis and stent fracture.

Implication of the OPG-RANKL-RANK axis in the formation of OM and potential as a plasmatic marker of arterial calcification

Similarly to what we found at the carotid level, we observed a significantly higher

presence of OPG in femoral plaques with OM (Fig. 2) (ref). The OPG-RANKL-RANK triad is recognized as an active player in arterial calcification process yet its exact role, inhibitor or inducer of arterial calcification remains subject to controversies (12). We here observed that intraplaque OPG was significantly associated with the presence of OM (Fig. 2A), suggesting that OPG secretion in the plaque leads to the formation of mineralized tissue. Besides its role within the plaque, OPG has also a potential as a plasmatic marker of calcific burden and of arterial disease severity (12). We recently found that OPG levels were significantly higher in the plasma of patients presenting with OM+ compared to OM- carotid lesions. We did not observe the same result here, maybe due to the lack of patients. However, levels of RANKL were significantly lower and OPG/ RANKL ratio was significantly higher in the plasma of patients presenting with OM in their femoral plaques (Fig. 2B). This results strongly support the implication of the OPG-RANKL-RANK axis in the regulation of arterial calcification and its relevance as a plasmatic marker of arterial calcification. Our previous results at the carotid level and the present results at the femoral level altogether suggest that OPG is an interesting marker of carotid plaque stability and that high OPG/ RANKL ratio is more reliable as a marker of femoral highly-calcified lesions.

The exact nature of the cells responsible for this ectopic mineral formation remains to be determined. Smooth muscle cells and endothelial cells are the most studied cell types in this perspective and they have been shown to have an osteochondrogenic potential (95). However other cell types are worth to be considered in this process, such as

pericytes. They are present along the arterial network (231) and have been shown both *in vitro* and *in vivo* to be able to differentiate along osteoblastic lineage (229). Moreover, they are critical cells in the angiogenesis and vasculogenesis processes (4) and are likely to be involved in intraplaque neovessels formation (238). Intraplaque neovessels have been identified to co-localize with arterial calcification (238) and are determinant in the onset of intraplaque hemorrhage (232). Altogether, these notions suggest that pericyte cells are at the crossroads of critical processes involved in arterial calcification. Supporting this hypothesis, we have previously found that pericyte cells were significantly more present in the carotid plaques that displayed OM. Here, immuno-histochemical analysis of femoral plaques found that pericytes were more abundant in the OM+ femoral plaques however this difference was not significant. Again, this may be due to an insufficient number of lesions analyzed. In contrast, no difference whatsoever was observed between OM+ and OM- femoral plaques in terms of smooth muscle cells and endothelial cells presence (Fig. 3). Histological as well as plasmatic results indicated that pericytes and the OPG-RANKL-RANK axis were strongly associated with the presence of OM. As in bone tissue, wherein osteoblast regulate bone formation through OPG secretion (148), we hypothesized that pericytes could play a similar role in the arterial wall. Indeed, elisa experiments showed that pericytes supernatant contained high amount of OPG in comparison to smooth muscle and endothelial cells (Fig. 4). This OPG secretion is all the more intense when pericytes were cultured in an osteogenic inducing medium or in inflammatory conditions. We also found that pericytes

supernatant significantly inhibited the osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells (Hu-MSC). This effect was abolished when inflammatory-conditioned pericytes supernatant were used (Fig. 4). We recently showed that the same pericytes supernatant inhibited the osteoclastic differentiation of CD14⁺ cells, even in inflammatory conditions. Altogether, these results suggest that pericytes, within plaque micro-environment, inhibit the onset of mineralization by inhibiting osteoblastic and osteoclastic differentiation of cell precursors. In the context of atherosclerotic disease, chronic inflammatory stress induce an imbalance in this coupling process with a shift towards more mineral formation than resorption. The abundant OPG secretion suggest that, among other cues, the consecutive increase of the OPG/ RANKL ratio contribute to this phenomenon.

Limitation

The main limitation is the small number of lesions studied, limiting the statistical power of our conclusions. The OM is likely to have a clinical impact but to date there is no imaging modality able to identify it preoperatively, limiting its clinical relevance. The OPG and RANKL cytokines are highly-interesting to be used as plasmatic markers. However, our results are based on a single blood sample harvested the day before surgery. Consequently, these results must be confirmed on serial blood sample examinations and ideally correlated with the onset of clinical events. Finally, our *in vitro* findings on pericytes should be confirmed using intraplaque pericytes, which is technically challenging.

Conclusion

Our results show that the prevalence of OM in the femoral territory is frequent and higher than in other vascular beds, suggesting that the calcic component of atheromatous plaques is a critical determinant of the heterogeneity existing between the different vascular beds. The clinical impact of OM in femoral plaques remains to be determined. Confirming our results at the carotid level, we also found that high intraplaque OPG and high OPG/ RANKL ratio were significantly associated with the presence of OM in femoral lesions. As in our previous work on carotid lesions, the present studies confirm the potential of pericytes as key player in the formation of arterial calcification.

Table 1: Demographic parameters, cardiovascular risk factors, cardiovascular co-morbidities and treatment of patients.

	Total (n=43)	OM+ (n=28)	OM- (n=15)	P
Age*	69.2 1.5	70 1.9	68 2.3	0.512
Male, n(%)	37(86%)	25 (89%)	12 (80%)	0.647
BMI*	26.4 0.6	26.6 0.7	25.9 1	0.588
Dyslipemia, n(%)	36 (84%)	23 (82%)	14 (88%)	1.0
LDL (g/L)*	0.9 0	0.9 0.1	1 0.1	0.378
HDL (g/L)*	0.5 0	0.45 0.0	0.5 0.0	0.298
Chol. Total (g/L)*	1.8 0.3	1.9 0.5	1.8 0.2	0.923
Smokers, n(%)	29 (67%)	19 (70%)	11 (65%)	0.748
HT, n(%)	35 (81%)	28 (82%)	13 (93%)	0.656
Diabetes, n(%)	9 (21%)	7 (24.1%)	2 (13%)	0.695
Creatinin clear. (ml/ min)*	78.4 3.4	93.1 11.4	82.2 9.2	0.518
CAD, n(%)	22 (51%)	16 (55%)	8 (50%)	0.765
CVD, n(%)	3 (7%)	2 (7%)	1 (7%)	1
CEI, n(%)	21 (51%)	13 (48%)	8 (53%)	0.760
Sartan, n(%)	10 (24%)	8 (30%)	2(13%)	0.286
Statin, n(%)	33 (77%)	18 (67%)	14 (93%)	0.068
APA, n(%)	39 (91%)	25 (93%)	14 (93%)	1
2 APA, n(%)	5 (12%)	2 (7%)	3 (20%)	0.33
VKA, n(%)	4 (9.3%)	3(19%)	1 (14%)	1
Vit D (ng/ml)*	12.9 1.2	12.9 1.5	13.9 1.8	0.931

Calcium (mmol/l)*	1.2 0	1.2 0	1.2 0	0.103
PTH (pg/ml)*	54.5 3.6	53 4.5	57 5.8	0.581

*Presented as median and SEM

TROISIEME PARTIE : Etude de la relation péricytes-monocytes/macrophages dans la formation des lésions athéromateuses (partie en cours)

Introduction

Un des modèles les plus reconnus de physiopathologie de l'athérosclérose consiste à considérer cette pathologie comme un désordre inflammatoire chronique (245). Selon ce modèle, l'exposition chronique aux différents facteurs de risques de la maladie athéromateuse conduit à des modifications de la paroi artérielle. La première étape est une dysfonction endothéliale. L'endothélium perd ses propriétés anticoagulantes pour acquérir des propriétés pro-coagulantes, la barrière endothéliale devient perméable et propice à la fixation des cellules sanguines en particulier des monocytes macrophages (Fig. 3). Après cette fixation des macrophages sur l'endothélium activé, il se produit un phénomène de rolling, d'arrêt et de migration des monocytes à travers l'endothélium par diapédèse. Les monocytes se retrouvent ensuite dans l'espace sous-intimal puis se différencient en macrophages spécialisés dans la phagocytose des lipides, devenant des cellules spumeuses, contribuant au développement du cœur nécrotique. La première partie de migration a été largement étudiée et décrite (8) (Fig. 19). Par opposition, la deuxième partie, à savoir le devenir des macrophages lésionnels est moins bien connu. Des travaux récents ont montré, par analogie à la différenciation des lymphocytes T, que les macrophages pouvaient acquérir une variété de profils phénotypiques. Des macrophages M1 et M2 ont ainsi été décrits, y compris dans le cadre de l'athérosclérose. Les premiers, inflammatoires, auraient un rôle d'aggravation des lésions alors que les deuxièmes, par opposition, auraient un rôle de régression des lésions en particulier en raison de propriétés d'efférocytose (281). En réalité, il existe entre les deux profils M1 et M2 tout un éventail de profils intermédiaires que les macrophages pourraient acquérir. Enfin, les monocytes-macrophages ont également la capacité de se différencier en cellules de type ostéoclastes, propriété particulièrement intéressante dans l'étude des calcifications artérielles (282). Des travaux récents ont montré l'implication des macrophages dans l'initiation des microcalcifications artérielles (271), elles-mêmes ayant un rôle fort sur la stabilité des plaques athéromateuses (270). D'autre part, l'implication des péricytes dans les calcifications artérielles a été détaillée plus haut et nos résultats *in vitro* supportent cette hypothèse. Il a été établi que dans un contexte d'inflammation chronique, les péricytes pouvaient avoir une action directe sur les cellules inflammatoires de types neutrophiles et monocytes (236). En condition d'inflammation chronique, les péricytes présents au niveau sous-endothélial exercent un effet d'attraction et de reprogrammation des monocytes. Cet effet se produit par contact direct par liaisons inter-cellulaires ainsi que de manière indirecte par effet paracrine. La résultante est la migration directe et plus rapide vers le site inflammatoire des monocytes qui ont été en contact avec les péricytes par rapport à des monocytes qui n'auraient pas été « instruits » par les péricytes et qui migreraient de manière aléatoire une fois la

barrière endothéliale traversée (236). Ces données nous font émettre l'hypothèse que les péricytes, dans le contexte de l'athérome, pourraient avoir une influence sur le devenir phénotypique des macrophages de la plaque et participer à leur migration.

Résultats

Les péricytes ont un pouvoir chémo-attractant sur les monocytes

L'étude de la migration de cellules CD14⁺ à travers des chambres de co-culture a été réalisée afin de tester l'effet des péricytes sur la migration des monocytes. Les péricytes étaient mis en culture en milieu standard jusqu'à confluence. Des monocytes étaient ajoutés dans la chambre supérieure à différentes densités. Un gradient de SVF était utilisé et les monocytes pouvaient migrer selon des durées variables (entre ½ H et 24 H). La présence de péricytes dans la chambre inférieure induisait une migration accrue des monocytes par rapport à la présence de cytokines connues pour induire cet effet, tel le M-CSF ou l'OPG (Fig. 20).

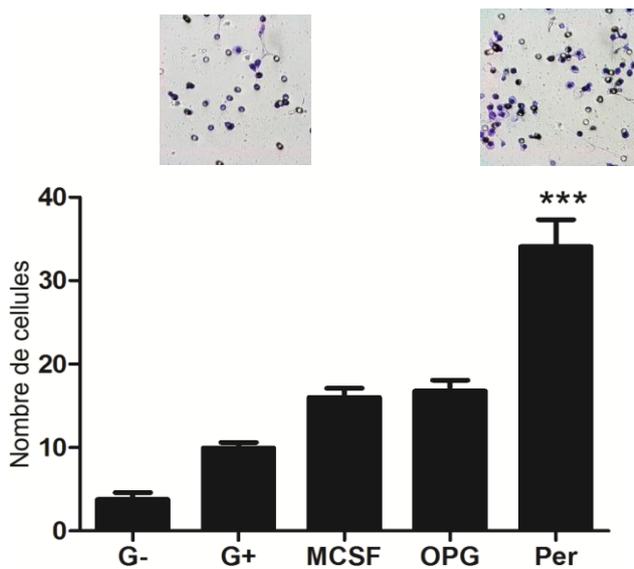
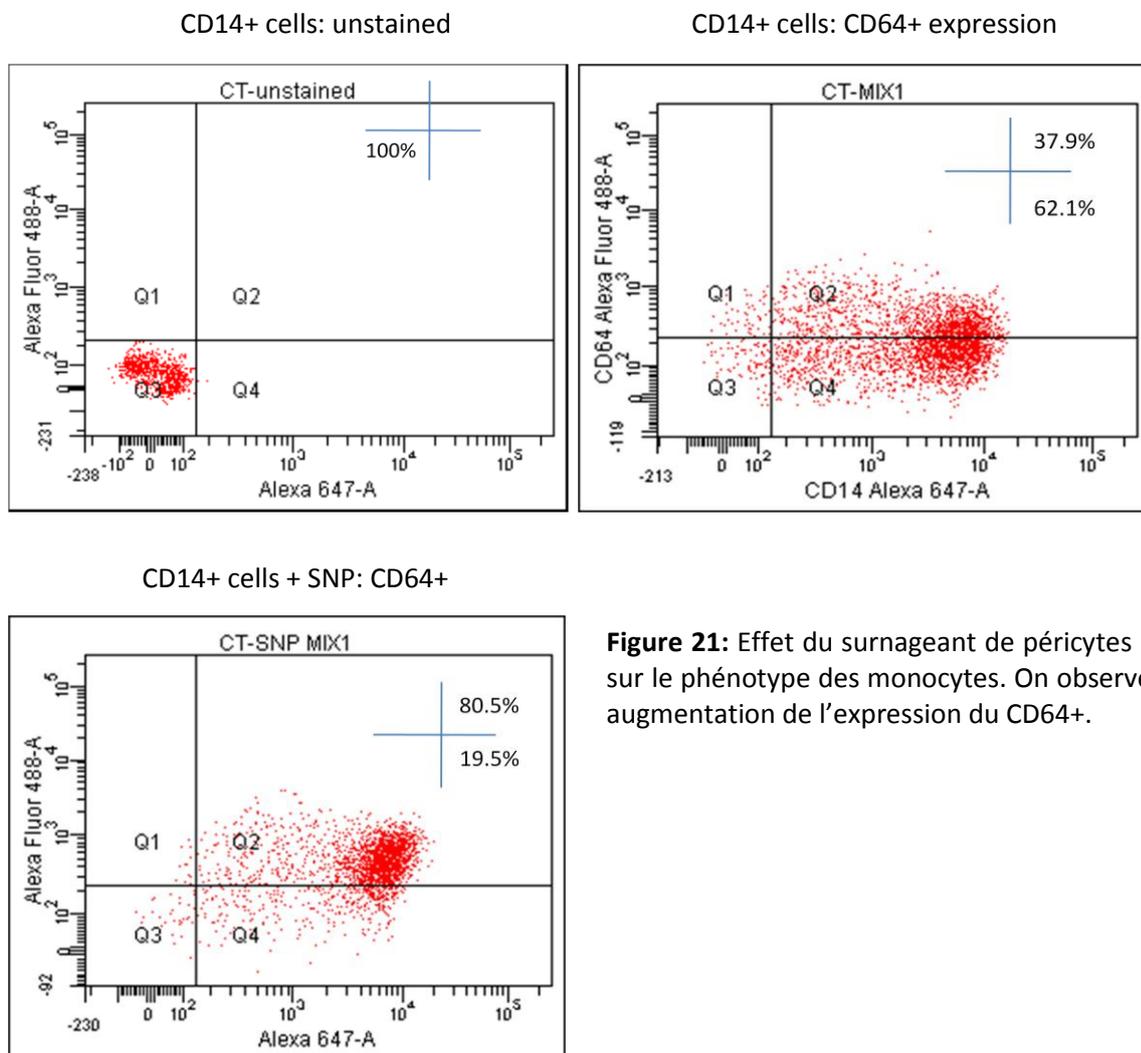


Figure 20: Migration de monocytes après 90 min. G-: pas de gradient de SVF, G+: gradient de SVF (photo correspondante), M-CSF: présence de M-CSF dans la chambre du bas, OPG: présence d'OPG dans la chambre du bas, Per: présence de péricytes (photos correspondantes)

Les péricytes favorisent la différenciation des monocytes en macrophages de type M2

Les cellules CD14⁺ étaient mises en cultures et orientées *in vitro* vers un phénotype M1 ou M2, ce qui servait de condition contrôle, à laquelle on comparait l'effet du surnageant de péricytes conditionnés ou non par des cytokines inflammatoires. Les CD14⁺ étaient ensuite étudiés en cytométrie de flux pour leur expression de marqueurs d'intérêt. La stimulation par le surnageant péricytaire augmentait l'expression du CD14⁺, augmentait légèrement l'expression du CD64⁺, et diminuait fortement le niveau d'expression du CD200R⁺ à la surface des monocytes. On ne notait pas d'effet sur l'expression des marqueurs CD16⁺ et CD163⁺. Par comparaison, lorsque les cellules CD14⁺ étaient stimulées par du surnageant de péricytes conditionnés au TNF- α , on notait une chute importante de l'expression des marqueurs CD16⁺, CD200R⁺ et CD64⁺ (Figure 21, analyse en cours).



Les monocytes influencent la capacité de minéralisation des péricytes

Si les péricytes ont la capacité d'influer sur les monocytes, l'inverse peut être vrai. Nous avons donc testé l'effet du surnageant de monocytes sur la minéralisation des péricytes. Nous avons observé un effet inhibiteur de ce surnageant (y compris lorsqu'il était obtenu après stimulation des monocytes par le TNF- α ou l'IL-6) sur la capacité de minéraliser des péricytes évaluée par coloration au Rouge Alizarine (Fig. 22, en cours). Ce résultat est bien sûr à interpréter avec prudence et il faudrait, outre le confirmer, avoir une hypothèse sur le possible mécanisme sous-jacent à cet effet.

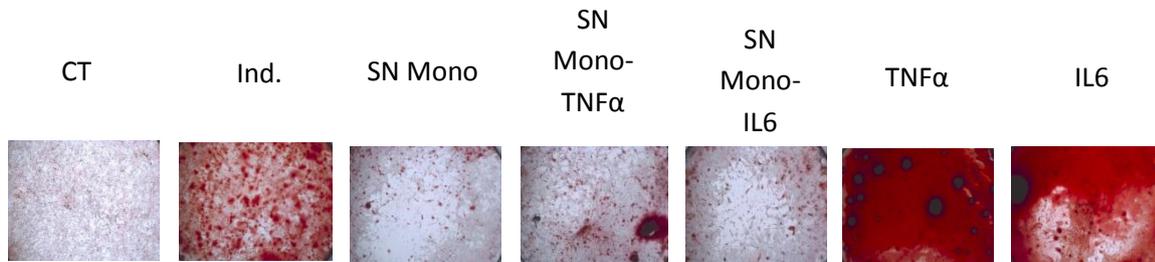
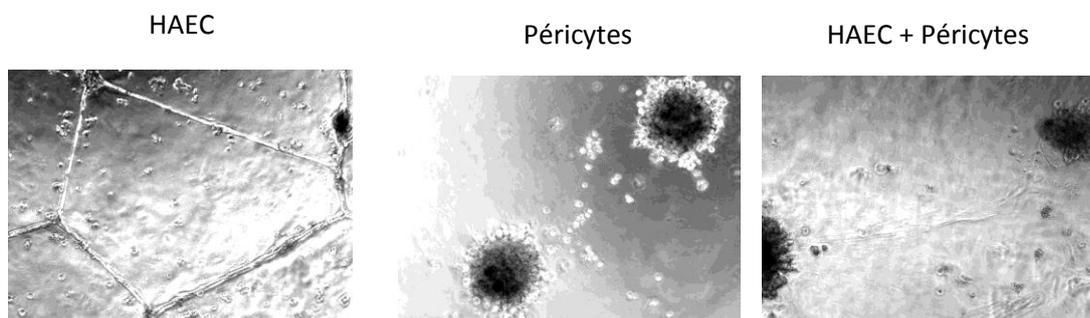


Figure 22: Influence du surnageant de monocytes (SN Mono) sur la minéralisation des péricytes. Les photos représentent des péricytes en culture cellulaire après 18 jours en milieu inducteur de minéralisation. Le surnageant était ajouté à 20% de concentration, le TNF- α et l'IL-6 à 50ng/ml, coloration au Rouge Alizarine.

Effet des monocytes sur les capacités d'angiogénèse des péricytes

Il s'agit de manipulations qui restent à venir. Le but est d'étudier l'influence des péricytes sur la formation de tubules par les cellules endothéliales. Dans un second temps, nous souhaiterions introduire un système à 3 acteurs cellulaires en ajoutant les monocytes. Nous avons simplement validé la formation des tubules par les cellules endothéliales cultivées dans du matrigel (Human Arterial Endothelial Cells, HAEC), ainsi que de péricytes et nous avons testé l'effet de la co-culture des deux types cellulaires en matrigel (photos ci-dessous).



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La formation des calcifications artérielles est un processus complexe et encore incomplètement élucidé

Ce travail est basé sur l'étude d'une biocollection humaine d'artères, plasmas et données cliniques issus de patients opérés dans le service de Chirurgie Vasculaire du CHU de Nantes. L'hypothèse de travail de départ est que les lésions athéromateuses diffèrent notablement d'un territoire artériel à l'autre et que la composante calcique est un des déterminants majeurs de cette hétérogénéité. A l'étage carotidien, nous avons observé la présence de différents types de calcifications artérielles: calcifications nodulaires, à centre clair, pavées et métaplasie ostéoïde. Cette dernière, qui contient tous les éléments d'un tissu osseux mature, retient particulièrement l'intérêt. En effet, suivant la théorie émise par plusieurs équipes, en particulier celle de Demer, la formation des calcifications artérielles reproduit l'ossification physiologique (72). La présence de tissu ostéoïde dans une lésion artérielle serait donc la forme la plus aboutie de minéralisation. Elle pourrait refléter le fait que la lésion évolue depuis longtemps et que le tissu minéral a eu le temps de mûrir suffisamment pour aboutir à sa forme la plus organisée. Néanmoins, on observe très fréquemment plusieurs types de calcifications artérielles différentes au sein d'une même lésion, et la métaplasie ostéoïde n'est le plus souvent pas la forme prédominante de tissu minéral dans les lésions. Les autres types de calcifications seraient alors des formes moins évoluées qui n'auraient pas eu le temps en quelque sorte de devenir de l'os mature. Une autre explication serait que plusieurs mécanismes conduisant à la formation de tissu minéral peuvent co-exister dans une même paroi artérielle calcifiée. Il existe en effet des théories alternatives et complémentaires à celle évoquée plus haut (241, 271). Dans ce cas, des vésicules matricielles et corps apoptotiques relargués par les cellules formeraient un environnement propice à l'agrégation de cristaux et à la minéralisation. Cet environnement pourrait à son tour induire la différenciation ostéogénique de précurseurs cellulaires environnants, ce qui fait dire que ces deux mécanismes peuvent co-exister et se compléter. L'identification précise de ces processus reste encore à être établie. Les choses sont encore plus complexes si l'on introduit le fait qu'il faille distinguer calcifications intimes et médiales. Les premières, associées à l'athérosclérose, résulteraient d'un processus d'ossification. Les secondes, rencontrées plutôt sur un terrain de diabète, insuffisance rénale chronique, âge avancé, seraient en rapport avec des troubles du métabolisme phospho-calcique (104, 119, 283). L'étude de désordres génétiques rares conduisant à des pathologies artérielles calcifiantes semble confirmer le rôle prépondérant du phosphate (7, 101). Dans ces pathologies, un déséquilibre entre taux de pyrophosphate (PPi, inhibiteur des calcifications) et phosphate inorganique (favorisant la formation des cristaux) est présent et implique l'enzyme TNAP (Tissue Non specific Alkaline Phosphatase) (96). De plus, l'élastine a été montrée comme étant associée à la formation des calcifications artérielles (106). Cette protéine étant absente de l'os, ce résultat suggère que des mécanismes propres à la paroi artérielle existent et peuvent rendre compte en partie de la formation

des calcifications artérielles. Une dernière réflexion peut être faite concernant la formation d'os. Il est désormais établi qu'il existe un lien étroit entre tissu osseux et formation des calcifications artérielles. Néanmoins, un paramètre essentiel est celui de la contrainte mécanique du tissu osseux. Le tissu artériel calcifié n'a pas de fonction mécanique et n'est pas soumis aux mêmes contraintes. Or les contraintes mécaniques influent fortement sur l'aspect du tissu osseux. Les ostéocytes dans le fémur ont ainsi une forme et une organisation bien différentes de ceux présents dans la calvaria. Ceci suggère que, même si les mécanismes qui conduisent à la formation de tissu minéralisé sont similaires dans les os et les artères, l'aspect final que prend le tissu minéralisé va dépendre de facteurs locaux propres à chaque tissu.

Ces notions mettent en évidence que le processus de calcification au sein de la paroi artérielle est extrêmement complexe et encore incomplètement élucidé.

Eléments apportés par ce travail

Métablasie ostéoïde

Ce travail apporte des éléments descriptifs sur les calcifications artérielles associées aux lésions athéromateuses. Il s'est focalisé sur la présence de métablasie ostéoïde et a montré que celle-ci était retrouvée dans les lésions carotidiennes dans moins de 20% des cas, ce qui est conforme avec les chiffres disponibles dans la littérature. De manière intéressante, la MO n'était jamais rencontrée dans les lésions carotidiennes symptomatiques, indiquant que la MO est un élément très informatif sur le caractère stable de la plaque. L'identification des caractéristiques, et des mécanismes sous-jacents, à l'origine du caractère stable ou non d'une plaque carotidienne est l'enjeu majeur qui permettrait d'améliorer la prise en charge des sténoses serrées carotidiennes. Des méthodes d'imagerie permettant d'identifier la MO permettrait ainsi d'identifier un groupe de patients à faible risque d'événements neurologiques. Au niveau fémoral, l'impact clinique de la MO est plus difficile à établir. Les lésions fémorales sont des lésions qui ont sans doute évolué plus longtemps que les lésions carotidiennes. L'observation de MO dans 65% des cas laisse donc à penser que la MO est une forme évoluée de calcification artérielle. Ce résultat apporte en tout cas un élément nouveau, dans la mesure où un tel chiffre n'est pas observé dans les autres territoires artériels. Ceci suggère que la composante calcique de la plaque est un des facteurs qui distinguent les territoires artériels les uns par rapport aux autres. Il est important dans la suite de ce projet d'étendre le travail aux autres lits artériels périphériques, beaucoup moins bien décrits que le territoire coronaire, afin de compléter ces données.

Péricytes et OPG

Tant au niveau carotidien que fémoral, les marquages immuno-histochimiques montrent que les péricytes sont présents dans les lésions. Le marquage de ces cellules est délicat et repose sur l'utilisation de plusieurs anticorps. Néanmoins, il s'agit du seul marquage qui variait en fonction des groupes de lésions étudiés (présence ou non de MO, symptômes ou non) alors qu'on ne notait pas de

différence en termes de CML ni CE. Il semble donc qu'il existe une population cellulaire dans la paroi artérielle qui garde des propriétés de précurseurs mésenchymateux qui leur permettent, en condition pathologique, d'influer sur le micro-environnement de la plaque. Quand à l'impact sur la minéralisation: Est-ce que ces cellules sont présentes dans les vaisseaux à l'état quiescent et peuvent proliférer et se différencier en réponse à certains stimuli? Ou induisent-elles la dé-différenciation des CML environnantes qui à leur tour minéralisent? Induisent-elles le recrutement d'autres cellules depuis la lumière ou depuis l'adventice? Quel est le rôle exact de ces cellules sur le comportement des macrophages intraplaque? Toutes ces questions sont autant d'axes de recherche qui restent à explorer. Néanmoins, notre hypothèse était, par analogie au tissu osseux, que les péricytes réunissaient toutes les caractéristiques pour être le pré-ostéoblaste de la paroi artérielle et d'autre part que l'OPG jouait sans doute un rôle clé dans ce processus. Le rôle des péricytes: capacité à minéraliser, à influencer la différenciation de précurseurs de la minéralisation ou de la résorption osseuse, est résumé dans la Figure 23.

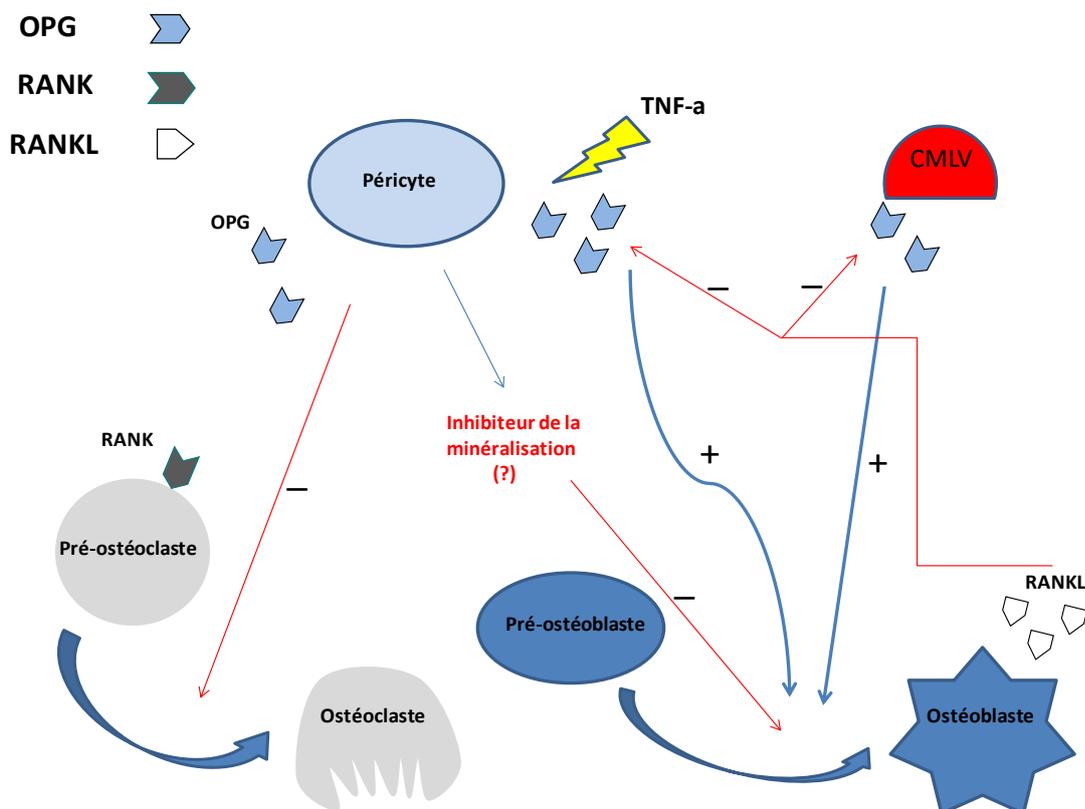


Figure 23: Schéma reprenant nos principaux résultats et notre hypothèse de travail. Dans la paroi vasculaire, les péricytes préviennent la formation des calcifications vasculaires en produisant un inhibiteur. En cas de stress inflammatoire (TNF-α), les péricytes et les CMLV produisent de grandes quantités d'OPG qui induisent la minéralisation de cellules (Pré-ostéoblastes) capables de se différencier en ostéoblastes. Ces pré-ostéoblastes dans nos manipulations sont les Hu-MSC et dans la paroi artérielle il peut s'agir 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 que sont les cellules CD14+ dans nos expériences et les macrophages dans les plaques. Il existerait donc dans la paroi artérielle tout comme dans le tissu osseux une balance entre résorption et minéralisation dont l'équilibre serait influencé par le ratio OPG/ RANKL.

Les perspectives pour la suite de cette partie sont de poursuivre la biocollection en cours: isolement des CML et de CE des différents territoires artériels périphériques. L'implication des différentes cellules dans la minéralisation pourra être évaluée de manière comparative. L'influence des péricytes sur les cellules des divers territoires pourra être étudiée par co-culture. Un aspect qui serait très informatif serait d'isoler les péricytes de la plaque. Cet isolement est possible à partir du tissu adipeux ou du muscle strié, ou encore de la rétine ou de certains vaisseaux mais reste très complexe dans notre expérience à partir des plaques d'athérome.

La validité de notre hypothèse en ce qui concerne l'OPG est supportée par: (i) d'une part la capacité importante des péricytes à sécréter de l'OPG et (ii) d'autre part par nos résultats concernant l'OPG. Nous avons en effet trouvé systématiquement une association positive entre MO et présence d'OPG dans la plaque. En particulier, les taux plasmatiques d'OPG étaient significativement liés au caractère asymptomatique des plaques carotidiennes. L'utilisation de l'OPG comme marqueur plasmatique de la stabilité des plaques athéromateuses carotidiennes mérite d'être considérée sur la base de nos résultats et doit être confirmée par une autre étude.

Les calcifications artérielles sont liées à la maladie athéromateuses et à des désordres métaboliques comme le diabète et l'insuffisance rénale chronique mais représentent un entité à part. Les traitements disponibles (comme par exemple les statines ou les antiagrégant plaquettaires), s'ils font régresser la maladie athéromateuse, n'agissent pas directement sur les calcifications artérielles. Les facteurs de risque cardiovasculaire classiques ne rendent pas compte de l'ensemble des mécanismes liés à l'apparition des calcifications artérielles. Les calcifications sont au premier plan de nombreuses lésions et pathologies comme détaillé plus haut. Cependant, il n'existe pas à ce jour de traitement spécifique des calcifications artérielles qui ait prouvé une réelle efficacité et c'est sans doute sur cet aspect thérapeutique que les efforts de recherche doivent porter dans les années à venir.

Bilan

Publications

Osteoprotegerin, pericytes and bone-like vascular calcification are associated with carotid plaque stability. PLOS ONE, accepté. 1^{er} auteur

Bone-like tissue arterial calcification in femoral atherosclerotic lesions : prevalence and role of osteoprotegerin and pericytes. Insights from the ECLA study. Atherosclerosis, soumis. 1^{er} auteur.

Role of the OPG/RANK/RANKL triad in calcifications in atheromatous plaques : comparison between carotid and femoral beds. Cytokine. 2012 May;58(2):300-6. 3^{ème} auteur.

Arterial Heterogeneity. Rev Med Interne. 2013 Jan;34(1):61-5. 2^{ème} auteur.

En préparation:

Revue sur les calcifications artérielles

Revue sur les péricytes

Autres

Au cours de cette thèse j'ai obtenu un **Poste d'Accueil Inserm**, financement de 2 ans qui m'a permis de travailler à plein temps sur ce projet.

Ce projet de thèse a abouti à la rédaction d'un projet de recherche de type PHRC dont la lettre d'intention a été acceptée cette année.

REFERENCES

1. 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 reviews*. 2004;15(6):457-75. Epub 2004/11/25.
2. Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, Seki S, Kasai M, Utsuyama M, et al. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;314(4):1021-7. Epub 2004/01/31.
3. 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; a journal of cerebral circulation*. 2007;38(10):2698-705. Epub 2007/09/01.
4. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research*. 2005;97(6):512-23. Epub 2005/09/17.
5. Montecucco F, 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? *Clinical & developmental immunology*. 2007;2007:75805. Epub 2008/03/06.
6. Doherty TM, Uzui H, Fitzpatrick LA, Tripathi PV, Dunstan CR, Asotra K, et al. Rationale for the role of osteoclast-like cells in arterial calcification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(6):577-82. Epub 2002/03/29.
7. St Hilaire C, Ziegler SG, Markello TC, Brusco A, Groden C, Gill F, et al. NT5E mutations and arterial calcifications. *The New England journal of medicine*. 2011;364(5):432-42. Epub 2011/02/04.
8. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145(3):341-55. Epub 2011/05/03.
9. Holen I, Shipman CM. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(3):279-91. Epub 2006/02/09.
10. Canfield AE, Doherty MJ, Wood AC, Farrington C, Ashton B, Begum N, et al. Role of pericytes in vascular calcification: a review. *Zeitschrift fur Kardiologie*. 2000;89 Suppl 2:20-7. Epub 2000/04/19.
11. Baud'huin M, Duplomb L, Teletchea S, Lamoureux F, Ruiz-Velasco C, Maillason M, et al. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine & growth factor reviews*. 2013;24(5):401-9. Epub 2013/07/06.
12. Venuraju SM, Yerramasu A, Corder R, Lahiri A. Osteoprotegerin as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular mortality and morbidity. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(19):2049-61. Epub 2010/05/08.
13. Catala M. *AJM, Katsanis G., Poirier J, . Histologie: organes, systèmes et appareils*2007.
14. Fawcett DW JR. In: Maloine E, editor. *Histologie - L'essentiel*2002. p. p199-201.
15. Bonnet J. *Athérosclérose. EMC- Cardiologie Angéiologie*. 2005;2:436-58.
16. Breslow JL. Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nature medicine*. 1997;3(6):600-1. Epub 1997/06/01.
17. Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *The New England journal of medicine*. 1997;337(19):1360-9. Epub 1997/11/14.
18. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1994;14(5):840-56. Epub 1994/05/01.

19. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995;15(9):1512-31. Epub 1995/09/01.
20. Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, et al. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation*. 1996;93(7):1354-63. Epub 1996/04/01.
21. Virmani R, Burke AP, Farb A. Sudden cardiac death. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2001;10(6):275-82. Epub 2002/01/05.
22. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340(2):115-26. Epub 1999/01/14.
23. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344(8934):1383-9. Epub 1994/11/19.
24. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *The New England journal of medicine*. 1995;333(20):1301-7. Epub 1995/11/16.
25. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *The New England journal of medicine*. 1987;316(22):1371-5. Epub 1987/05/28.
26. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986;6(2):131-8. Epub 1986/03/01.
27. Libby P. Atheroma: more than mush. *Lancet*. 1996;348 Suppl 1:s4-7. Epub 1996/11/01.
28. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(34):20963-6. Epub 1997/08/22.
29. Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *The American journal of pathology*. 1995;147(2):251-66. Epub 1995/08/01.
30. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 1990;344(6263):254-7. Epub 1990/03/15.
31. Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunology today*. 1990;11(3):97-101. Epub 1990/03/01.
32. Hajjar DP, Haberland ME. Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(37):22975-8. Epub 1997/09/12.
33. Chobanian AV, Alexander RW. Exacerbation of atherosclerosis by hypertension. Potential mechanisms and clinical implications. *Archives of internal medicine*. 1996;156(17):1952-6. Epub 1996/09/23.
34. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*. 1997;96(11):4095-103. Epub 1997/12/24.
35. Vyalov S, Langille BL, Gotlieb AI. Decreased blood flow rate disrupts endothelial repair in vivo. *The American journal of pathology*. 1996;149(6):2107-18. Epub 1996/12/01.
36. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(2):885-91. Epub 1994/08/01.
37. Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(10):4591-5. Epub 1993/05/15.

38. Lin MC, Almus-Jacobs F, Chen HH, Parry GC, Mackman N, Shyy JY, et al. Shear stress induction of the tissue factor gene. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(4):737-44. Epub 1997/02/15.
39. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *The American journal of pathology*. 1998;152(2):353-8. Epub 1998/02/18.
40. Rosenfeld ME, Ross R. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis*. 1990;10(5):680-7. Epub 1990/09/01.
41. Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1989;9(5):567-78. Epub 1989/09/01.
42. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362(6423):801-9. Epub 1993/04/29.
43. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta3 integrin, and GPIbalpha. *The Journal of experimental medicine*. 1998;187(3):329-39. Epub 1998/03/21.
44. Xu C, Zarins CK, Glagov S. Aneurysmal and occlusive atherosclerosis of the human abdominal aorta. *Journal of vascular surgery*. 2001;33(1):91-6. Epub 2001/01/04.
45. Hayashi H, Matsuoka Y, Sakamoto I, Sueyoshi E, Okimoto T, Hayashi K, et al. Penetrating atherosclerotic ulcer of the aorta: imaging features and disease concept. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*. 2000;20(4):995-1005. Epub 2000/07/21.
46. Mehta RH, O'Gara PT, Bossone E, Nienaber CA, Myrmel T, Cooper JV, et al. Acute type A aortic dissection in the elderly: clinical characteristics, management, and outcomes in the current era. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(4):685-92. Epub 2002/09/03.
47. Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(7):1282-92. Epub 2010/06/18.
48. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2007;33 Suppl 1:S1-75. Epub 2006/12/05.
49. Adam DJ, Beard JD, Cleveland T, Bell J, Bradbury AW, Forbes JF, et al. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;366(9501):1925-34. Epub 2005/12/06.
50. Boylan MJ, Lytle BW, Loop FD, Taylor PC, Borsh JA, Goormastic M, et al. Surgical treatment of isolated left anterior descending coronary stenosis. Comparison of left internal mammary artery and venous autograft at 18 to 20 years of follow-up. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1994;107(3):657-62. Epub 1994/03/01.
51. Otsuka F, Yahagi K, Sakakura K, Virmani R. Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis? *Annals of cardiothoracic surgery*. 2013;2(4):519-26. Epub 2013/08/27.
52. DeBaakey ME, Glaeser DH. Patterns of atherosclerosis: effect of risk factors on recurrence and survival-analysis of 11,890 cases with more than 25-year follow-up. *The American journal of cardiology*. 2000;85(9):1045-53. Epub 2000/04/27.
53. Lal BK, HRn, 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 38(6):1162-8.
54. Schillinger M, SS, 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 115(21):2745-9.
55. Babapulle MN, EM. Coated stents for the prevention of restenosis: Part II. *Circulation*. 2002 106(22):2859-66.

56. Haider SN KE, Forlee M, Colgan MP, Madhavan P, Moore DJ, Shanik GD. Two-year outcome with preferential use of infrainguinal angioplasty for critical ischemia. *J Vasc Surg.* 2006 43(3):504-12.
57. Kastrati A SA, Dietz R, Neumann FJ, Richardt G. Time course of restenosis during the first year after emergency coronary stenting. *Circulation.* 1993 87(5):1498-505.
58. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature.* 2013;493(7432):338-45. Epub 2013/01/18.
59. Morice MC SP, 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 Engl J Med.* 2002 346(23):1773-80.
60. Duda SH, Bosiers M, Lammer J, Scheinert D, Zeller T, Oliva V, et al. Drug-eluting and bare nitinol stents for the treatment of atherosclerotic lesions in the superficial femoral artery: long-term results from the SIROCCO trial. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists.* 2006;13(6):701-10. Epub 2006/12/13.
61. Dake MD, Ansel GM, Jaff MR, Ohki T, Saxon RR, Smouse HB, et al. Paclitaxel-eluting stents show superiority to balloon angioplasty and bare metal stents in femoropopliteal disease: twelve-month Zilver PTX randomized study results. *Circulation Cardiovascular interventions.* 2011;4(5):495-504. Epub 2011/09/29.
62. Lugmayr H KM, Fröhler W, Meindl S, Zisch R. Sirolimus-eluting stents for the treatment of symptomatic extracranial vertebral artery stenoses: early experience and 6-month follow-up. *Rofo.* 2004 176(10):1431-5.
63. Schillinger M ME. Past, present and future of femoropopliteal stenting. *J Endovasc Ther.* 2009 16(Suppl 1):147-52.
64. Endo A, Hirayama H, Yoshida O, Arakawa T, Akima T, Yamada T, et al. Arterial remodeling influences the development of intimal hyperplasia after stent implantation. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(1):70-5.
65. Finet G, Weissman NJ, Mintz GS, Satler LF, Kent KM, Laird JR, et al. Mechanism of lumen enlargement with direct stenting versus predilatation stenting: influence of remodelling and plaque characteristics assessed by volumetric intracoronary ultrasound. *Heart (British Cardiac Society).* 2003;89(1):84-90.
66. Sahara M, Kirigaya H, Oikawa Y, Yajima J, Ogasawara K, Satoh H, 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.
67. van Gils MJ, Bodde MC, Cremers LG, Dippel DW, van der Lugt A. Determinants of calcification growth in atherosclerotic carotid arteries; a serial multi-detector CT angiography study. *Atherosclerosis.* 2013;227(1):95-9. Epub 2013/01/15.
68. Agatston AS JW, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;15(4):827-32.
69. Allison MA. CM, Wright CM. Patterns and Risk Factors for Systemic Calcified Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:331-6.
70. Hunt JL FR, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER 3rd. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke.* 2002;33(5):1214-9.
71. Jeziorska M MC, Wooley DE. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *Virchows Arch.* 1998;433(6):559-65.
72. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nature reviews Cardiology.* 2010;7(9):528-36. Epub 2010/07/29.
73. Herisson F, Heymann MF, Chetiveaux M, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, et al. Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis.* 2011;216(2):348-54. Epub 2011/03/04.

74. Aboyans V, Lacroix P, Criqui MH. Large and small vessels atherosclerosis: similarities and differences. *Progress in cardiovascular diseases*. 2007;50(2):112-25. Epub 2007/09/04.
75. Diehm N, Shang A, Silvestro A, Do DD, Dick F, Schmidli J, et al. Association of cardiovascular risk factors with pattern of lower limb atherosclerosis in 2659 patients undergoing angioplasty. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2006;31(1):59-63. Epub 2005/11/05.
76. 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. *Journal of vascular research*. 2006;43(3):251-69. Epub 2006/02/24.
77. 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. Epub 1964/12/01.
78. Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(6):1248-58. Epub 2007/03/24.
79. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2004;286(5):E686-96. Epub 2004/04/23.
80. 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16(8):978-83. Epub 1996/08/01.
81. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*. 2008;117(22):2938-48. Epub 2008/06/04.
82. Stary HC. Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression. *Zeitschrift fur Kardiologie*. 2000;89 Suppl 2:28-35. Epub 2000/04/19.
83. Karsenty G. The complexities of skeletal biology. *Nature*. 2003;423(6937):316-8. Epub 2003/05/16.
84. Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;473(2):188-92. Epub 2008/04/22.
85. 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. *Endocrine reviews*. 1999;20(3):345-57. Epub 1999/06/16.
86. Rousselle AV, Heymann D. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone*. 2002;30(4):533-40. Epub 2002/04/06.
87. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(4):1800-9. Epub 1993/04/01.
88. Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, 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):379-88. Epub 1998/03/26.
89. Shioi A, Katagi M, Okuno Y, Mori K, Jono S, Koyama H, et al. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circulation research*. 2002;91(1):9-16. Epub 2002/07/13.
90. Qiao JH, Mertens RB, Fishbein MC, Geller SA. Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: morphologic evidence of enchondral ossification. *Human pathology*. 2003;34(4):402-7. Epub 2003/05/07.
91. Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, et al. Biology and action of colony-stimulating factor-1. *Molecular reproduction and development*. 1997;46(1):4-10. Epub 1997/01/01.
92. Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP, et al. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *The American journal of pathology*. 1997;150(5):1687-99. Epub 1997/05/01.
93. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial

- calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(3):489-94. Epub 2003/03/05.
94. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(22):15319-27. Epub 2008/04/02.
95. Tintut Y, Parhami F, Bostrom K, Jackson SM, Demer LL. cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells. Potential signaling pathway for vascular calcification. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(13):7547-53. Epub 1998/04/29.
96. Harmey D, Hesse L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millan JL. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *The American journal of pathology*. 2004;164(4):1199-209. Epub 2004/03/25.
97. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1998;97(23):2307-15. Epub 1998/06/25.
98. Hsu HH, Camacho NP, Sun F, Tawfik O, Aono H. Isolation of calcifiable vesicles from aortas of rabbits fed with high cholesterol diets. *Atherosclerosis*. 2000;153(2):337-48. Epub 2001/02/13.
99. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1983;172(2):173-7. Epub 1983/02/01.
100. Ruf N, Uhlenberg B, Terkeltaub R, Nurnberg P, Rutsch F. The mutational spectrum of ENPP1 as arising after the analysis of 23 unrelated patients with generalized arterial calcification of infancy (GACI). *Human mutation*. 2005;25(1):98. Epub 2004/12/18.
101. Dlamini N, Splitt M, Durkan A, Siddiqui A, Padayachee S, Hobbins S, et al. Generalized arterial calcification of infancy: phenotypic spectrum among three siblings including one case without obvious arterial calcifications. *American journal of medical genetics Part A*. 2009;149A(3):456-60. Epub 2009/02/12.
102. Johnson K, Polewski M, van Etten D, Terkeltaub R. Chondrogenesis mediated by PPI depletion promotes spontaneous aortic calcification in *NPP1*^{-/-} mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(4):686-91. Epub 2004/12/31.
103. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(12):2959-64. Epub 2004/12/08.
104. Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in renal disease. *Clinical nephrology*. 2005;63(2):146-57. Epub 2005/02/26.
105. Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo JL, Rusanescu G, Iwamoto Y, et al. Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation*. 2009;119(13):1785-94. Epub 2009/03/25.
106. Hosaka N, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Kondo F, Koiwa F, et al. Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. *Calcified tissue international*. 2009;85(6):523-9. Epub 2009/10/07.
107. Li X, Yang HY, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2008;199(2):271-7. Epub 2008/01/09.
108. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(6):4388-94. Epub 2001/12/14.
109. Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, Lopez-Ongil S, et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circulation research*. 2009;104(9):1041-8. Epub 2009/03/28.
110. Mathew S, Davies M, Lund R, Saab G, Hruska KA. Function and effect of bone morphogenetic protein-7 in kidney bone and the bone-vascular links in chronic kidney disease. *European journal of clinical investigation*. 2006;36 Suppl 2:43-50. Epub 2006/08/04.

111. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386(6620):78-81. Epub 1997/03/06.
112. Bostrom K, Tsao D, Shen S, Wang Y, Demer LL. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(17):14044-52. Epub 2001/03/30.
113. Yao Y, Watson AD, Ji S, Bostrom KI. Heat shock protein 70 enhances vascular bone morphogenetic protein-4 signaling by binding matrix Gla protein. *Circulation research*. 2009;105(6):575-84. Epub 2009/08/08.
114. Schurgers LJ, Spronk HM, Skepper JN, Hackeng TM, Shanahan CM, Vermeer C, et al. Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function: importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5(12):2503-11. Epub 2007/09/13.
115. Rennenberg RJ, Kessels AG, Schurgers LJ, van Engelshoven JM, de Leeuw PW, Kroon AA. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vascular health and risk management*. 2009;5(1):185-97. Epub 2009/05/14.
116. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & development*. 1998;12(9):1260-8. Epub 1998/06/06.
117. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circulation research*. 2004;95(11):1046-57. Epub 2004/11/27.
118. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(8):1047-55. Epub 2002/10/23.
119. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circulation research*. 2005;96(7):717-22. Epub 2005/04/16.
120. Kiechl S, Schett G, Schwaiger J, Seppi K, Eder P, Egger G, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and risk for cardiovascular disease. *Circulation*. 2007;116(4):385-91. Epub 2007/07/11.
121. Tintut Y, Parhami F, Tsingotjidou A, Tetradis S, Territo M, Demer LL. 8-Isoprostaglandin E2 enhances receptor-activated NFkappa B ligand (RANKL)-dependent osteoclastic potential of marrow hematopoietic precursors via the cAMP pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(16):14221-6. Epub 2002/02/06.
122. Takaoka M, Nagata D, Kihara S, Shimomura I, Kimura Y, Tabata Y, et al. Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling. *Circulation research*. 2009;105(9):906-11. Epub 2009/09/19.
123. Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, et al. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation*. 2008;118(17):1748-57. Epub 2008/10/08.
124. Al-Aly Z, Shao JS, Lai CF, Huang E, Cai J, Behrmann A, et al. Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr-/- mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(12):2589-96. Epub 2007/10/13.
125. Shao JS, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(7):1423-30. Epub 2006/04/08.
126. Hruska KA, Saab G, Mathew S, Lund R. Renal osteodystrophy, phosphate homeostasis, and vascular calcification. *Seminars in dialysis*. 2007;20(4):309-15. Epub 2007/07/20.
127. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm 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(9360):827-33. Epub 2003/03/19.

128. Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, et al. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(10):2920-30. Epub 2005/08/12.
129. Holt C, Sorensen ES, Clegg RA. Role of calcium phosphate nanoclusters in the control of calcification. *The FEBS journal*. 2009;276(8):2308-23. Epub 2009/03/19.
130. Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Duan D, Wang E, Sturek MS, et al. Fetuin-A uptake in bovine vascular smooth muscle cells is calcium dependent and mediated by annexins. *American journal of physiology Renal physiology*. 2007;292(2):F599-606. Epub 2006/09/14.
131. Duer MJ, Friscic T, Proudfoot D, Reid DG, Schoppet M, Shanahan CM, et al. Mineral surface in calcified plaque is like that of bone: further evidence for regulated mineralization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(11):2030-4. Epub 2008/08/16.
132. Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, et al. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circulation research*. 2008;103(5):e28-34. Epub 2008/08/02.
133. Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CD, McCarthy GM, et al. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circulation research*. 2005;96(12):1248-56. Epub 2005/05/21.
134. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free radical biology & medicine*. 2001;31(4):509-19. Epub 2001/08/11.
135. Liberman M, Bassi E, Martinatti MK, Lario FC, Wosniak J, Jr., Pomerantzeff PM, et al. Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(3):463-70. Epub 2007/12/29.
136. Bear M, Butcher M, Shaughnessy SG. Oxidized low-density lipoprotein acts synergistically with beta-glycerophosphate to induce osteoblast differentiation in primary cultures of vascular smooth muscle cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;105(1):185-93. Epub 2008/05/08.
137. Mathew S, Tustison KS, Sugatani T, Chaudhary LR, Rifas L, Hruska KA. The mechanism of phosphorus as a cardiovascular risk factor in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(6):1092-105. Epub 2008/04/18.
138. Memon F, El-Abbadi M, Nakatani T, Taguchi T, Lanske B, Razzaque MS. Does Fgf23-klotho activity influence vascular and soft tissue calcification through regulating mineral ion metabolism? *Kidney international*. 2008;74(5):566-70. Epub 2008/06/06.
139. Qin L, Raggatt LJ, Partridge NC. Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2004;15(2):60-5. Epub 2004/03/24.
140. Poole KE, Reeve J. Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent. *Current opinion in pharmacology*. 2005;5(6):612-7. Epub 2005/09/27.
141. 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(13):1302-6. Epub 1998/09/30.
142. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Vitamin D and vascular calcification. *Current opinion in lipidology*. 2007;18(1):41-6. Epub 2007/01/16.
143. Norman PE, Powell JT. Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(1):39-46. Epub 2004/10/23.
144. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Moe SM. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2006;21(12):3435-42. Epub 2006/09/29.
145. Wang CC, Sorribas V, Sharma G, Levi M, Draznin B. Insulin attenuates vascular smooth muscle calcification but increases vascular smooth muscle cell phosphate transport. *Atherosclerosis*. 2007;195(1):e65-75. Epub 2007/04/07.

146. Scheinert D, Scheinert S, Sax J, Piorkowski C, Braunlich S, Ulrich M, et al. Prevalence and clinical impact of stent fractures after femoropopliteal stenting. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45(2):312-5. Epub 2005/01/18.
147. Davaine JM, Querat J, Guyomarch B, Brennan MA, Costargent A, Chaillou P, et al. Incidence and the clinical impact of stent fractures after primary stenting for TASC C and D femoropopliteal lesions at 1 year. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2013;46(2):201-12. Epub 2013/06/19.
148. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-19. Epub 1997/04/18.
149. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*. 1998;139(3):1329-37. Epub 1998/03/10.
150. Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, et al. 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):6113-21. Epub 1998/12/02.
151. Yamaguchi K, Kinoshita M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, et al. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(9):5117-23. Epub 1998/03/28.
152. Theoleyre S, Kwan Tat S, Vusio P, Blanchard F, Gallagher J, Ricard-Blum S, et al. 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. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;347(2):460-7. Epub 2006/07/11.
153. Lamoureux F, Picarda G, Garrigue-Antar L, Baud'huin M, Trichet V, Vidal A, et al. Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. *Cancer research*. 2009;69(2):526-36. Epub 2009/01/17.
154. Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, Trichet V, et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer research*. 2007;67(15):7308-18. Epub 2007/08/03.
155. Borset M, Hjertner O, Yaccoby S, Epstein J, 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):2528-36. Epub 2000/09/26.
156. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(50):41155-64. Epub 2005/10/11.
157. Schoppet M, Henser S, Ruppert V, Stubig T, Al-Fakhri N, Maisch B, et al. Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF-kappaB-dependent. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;100(6):1430-9. Epub 2006/12/16.
158. Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, 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. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(23):20659-72. Epub 2001/03/29.
159. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2000;15(1):2-12. Epub 2000/01/26.
160. Heymann MF, Riet A, Le Goff B, Battaglia S, Paineau J, Heymann D. OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions. *Regulatory peptides*. 2008;148(1-3):46-53. Epub 2008/03/28.
161. 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. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;250(3):776-81. Epub 1998/10/24.
162. 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(6):2205-12. Epub 2001/05/18.
163. Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, et al. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(39):36241-50. Epub 2001/07/14.
164. Gao YH, Shinki T, Yuasa T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, et al. Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;252(3):697-702. Epub 1998/12/05.
165. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al. 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(10):4382-9. Epub 1999/09/28.
166. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(4):463-74. Epub 2000/08/22.
167. Wittrant Y, Couillaud S, Theoleyre S, Dunstan C, Heymann D, Redini F. Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;293(1):38-44. Epub 2002/06/11.
168. Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani AM, Sturn DH, Patsch JR, et al. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(5):2964-71. Epub 2005/02/25.
169. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(10):1610-6. Epub 2001/10/13.
170. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007;64(18):2334-50. Epub 2007/05/29.
171. Baud'huin M, Duplomb L, Teletchea S, Charrier C, Maillason M, Fouassier M, et al. Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(46):31704-13. Epub 2009/09/18.
172. Benslimane-Ahmim Z, Heymann D, Dizier B, Lokajczyk A, Brion R, Laurendeau I, et al. Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011;9(4):834-43. Epub 2011/01/25.
173. Cross SS, Yang Z, Brown NJ, Balasubramanian SP, Evans CA, Woodward JK, et al. Osteoprotegerin (OPG)--a potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis? *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;118(8):1901-8. Epub 2005/11/16.
174. 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 microbiology letters*. 2006;264(2):238-45. Epub 2006/09/20.
175. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(6):464-78. Epub 2007/05/25.
176. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nature medicine*. 2005;11(3):261-2. Epub 2005/02/22.

177. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(23):14363-7. Epub 1998/06/11.
178. Pritzker LB, Scatena M, Giachelli CM. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Molecular biology of the cell*. 2004;15(6):2834-41. Epub 2004/04/06.
179. 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. *Thrombosis and haemostasis*. 2005;93(1):70-5. Epub 2005/01/05.
180. Secchiero P, Corallini F, Beltrami AP, Ceconi C, Bonasia V, Di Chiara A, et al. An imbalanced OPG/TRAIL ratio is associated to severe acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2010;210(1):274-7. Epub 2009/12/18.
181. Reid P, Holen I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *European journal of cell biology*. 2009;88(1):1-17. Epub 2008/08/19.
182. Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003;14(3-4):337-48. Epub 2003/06/06.
183. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(2):161-9. Epub 2002/01/24.
184. Zhang XD, Nguyen T, Thomas WD, Sanders JE, Hersey P. Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS letters*. 2000;482(3):193-9. Epub 2000/10/12.
185. Standal T, Seidel C, Hjertner O, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*. 2002;100(8):3002-7. Epub 2002/09/28.
186. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76. Epub 1998/05/06.
187. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(40):25190-4. Epub 1997/10/06.
188. 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):1419-26. Epub 2001/03/17.
189. Georges S, Ruiz Velasco C, Trichet V, Fortun Y, Heymann D, Padrines M. Proteases and bone remodelling. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009;20(1):29-41. Epub 2008/12/02.
190. Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, et al. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(48):36846-55. Epub 2006/10/05.
191. Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, Schlondorff J, et al. 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. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(19):13613-8. Epub 1999/05/01.
192. 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 reviews*. 2004;15(1):49-60. Epub 2004/01/30.
193. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone*. 1999;25(5):525-34. Epub 1999/11/26.
194. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;390(6656):175-9. Epub 1997/11/21.

195. Srivastava S, Matsuda M, Hou Z, Bailey JP, Kitazawa R, Herbst MP, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand induction via Jak2 and Stat5a in mammary epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(46):46171-8. Epub 2003/09/04.
196. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;275(3):768-75. Epub 2000/09/07.
197. 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(6):3353-62. Epub 2002/09/10.
198. Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(2):235-44. Epub 2004/02/19.
199. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(5):997-1001. Epub 1998/09/09.
200. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315-23. Epub 1999/02/09.
201. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(33):25103-8. Epub 2010/05/27.
202. Gruber R. Cell biology of osteoimmunology. *Wien Med Wochenschr*. 2010;160(17-18):438-45. Epub 2010/08/18.
203. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(3):1002-13. Epub 2006/01/24.
204. Ando K, Mori K, Redini F, Heymann D. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. *Current drug discovery technologies*. 2008;5(3):263-8. Epub 2008/08/12.
205. 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. *The Prostate*. 2008;68(1):92-104. Epub 2007/11/17.
206. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 2006;440(7084):692-6. Epub 2006/03/31.
207. Mikami S, Katsube K, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, et al. Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. *The Journal of pathology*. 2009;218(4):530-9. Epub 2009/05/21.
208. 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? *Histology and histopathology*. 2009;24(2):235-42. Epub 2008/12/17.
209. Hakozaiki A, Yoda M, Tohmonda T, Furukawa M, Hikata T, Uchikawa S, et al. Receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand induces ectodomain shedding of RANK in murine RAW264.7 macrophages. *J Immunol*. 2010;184(5):2442-8. Epub 2010/02/02.
210. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;253(2):395-400. Epub 1999/01/08.
211. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(4):1566-71. Epub 2000/03/04.

212. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(12):1998-2003. Epub 2001/12/18.
213. 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. *Biochemical pharmacology*. 2007;73(1):77-83. Epub 2006/10/31.
214. Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(28):20959-62. Epub 2000/05/16.
215. Scatena M, Giachelli C. The alpha(v)beta3 integrin, NF-kappaB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine*. 2002;12(2):83-8. Epub 2002/02/20.
216. Corallini F, Celeghini C, Rimondi E, di Iasio MG, Gonelli A, Secchiero P, et al. Trail down-regulates the release of osteoprotegerin (OPG) by primary stromal cells. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(9):2279-86. Epub 2011/06/11.
217. Kim HH, Shin HS, Kwak HJ, Ahn KY, Kim JH, Lee HJ, et al. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(14):2163-5. Epub 2003/09/23.
218. Kim YM, Lee YM, Kim HS, Kim JD, Choi Y, Kim KW, et al. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(9):6799-805. Epub 2001/12/14.
219. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoc A, Kilic R, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;36(1):57-66. Epub 2004/01/22.
220. 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. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2006;21(2):193-206. Epub 2006/01/19.
221. Helas S, Goettsch C, Schoppet M, Zeitz U, Hempel U, Morawietz H, et al. Inhibition of receptor activator of NF-kappaB ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. *The American journal of pathology*. 2009;175(2):473-8. Epub 2009/07/11.
222. Rouget C. Note sur le developpement de la tunique contractile des vaisseaux. *Compt Rend Acad Sci*. 1874(59):559-62.
223. Dore-Duffy P CK. Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol Biol*. 2011(686):49-68.
224. Le Lievre CS, Le Douarin NM. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1975;34(1):125-54. Epub 1975/08/01.
225. Hungerford JE, Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *Journal of vascular research*. 1999;36(1):2-27. Epub 1999/03/02.
226. Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development*. 2001;128(7):1059-68. Epub 2001/03/14.
227. Sims DE. The pericyte--a review. *Tissue & cell*. 1986;18(2):153-74. Epub 1986/01/01.
228. Schor AM, Canfield AE, Sutton AB, Arciniegas E, Allen TD. Pericyte differentiation. *Clinical orthopaedics and related research*. 1995(313):81-91. Epub 1995/04/01.
229. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official*

- journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 1998;13(5):828-38. Epub 1998/06/04.
230. Allt G, Lawrenson JG. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells, tissues, organs*. 2001;169(1):1-11. Epub 2001/05/08.
231. Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, Orekhov AN. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue & cell*. 1998;30(1):127-35. Epub 1998/05/07.
232. Liu Y, Wilkinson FL, Kirton JP, Jeziorska M, Iizasa H, Sai Y, et al. Hepatocyte growth factor and c-Met expression in pericytes: implications for atherosclerotic plaque development. *The Journal of pathology*. 2007;212(1):12-9. Epub 2007/04/04.
233. Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental cell*. 2011;21(2):193-215. Epub 2011/08/16.
234. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Donnenberg AD. Pericytes: a universal adult tissue stem cell? *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2012;81(1):12-4. Epub 2011/11/10.
235. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014;71(8):1353-74. Epub 2013/10/26.
236. Stark K, Eckart A, Haidari S, Tirniceriu A, Lorenz M, von Bruhl ML, et al. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nature immunology*. 2013;14(1):41-51. Epub 2012/11/28.
237. Nayak RC, Berman AB, George KL, Eisenbarth GS, King GL. A monoclonal antibody (3G5)-defined ganglioside antigen is expressed on the cell surface of microvascular pericytes. *The Journal of experimental medicine*. 1988;167(3):1003-15. Epub 1988/03/01.
238. Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circulation research*. 2005;96(9):930-8. Epub 2005/05/14.
239. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013. Epub 2013/10/26.
240. Zebdj AF, Shin V, Bostrom K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;90(4):756-65. Epub 2003/10/31.
241. 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. *Circulation research*. 2000;87(11):1055-62. Epub 2000/11/25.
242. Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *European heart journal*. 2011;32(16):1977-85, 85a, 85b, 85c. Epub 2011/03/15.
243. Moulton KS, Vakili K, Zurawski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvain E, et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(8):4736-41. Epub 2003/04/17.
244. Cheng C, Chrifi I, Pasterkamp G, Duckers HJ. Biological mechanisms of microvessel formation in advanced atherosclerosis: the big five. *Trends in cardiovascular medicine*. 2013;23(5):153-64. Epub 2013/02/05.
245. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American heart journal*. 1999;138(5 Pt 2):S419-20. Epub 1999/10/28.
246. Martin-Ventura JL, Duran MC, Blanco-Colio LM, Meilhac O, Leclercq A, Michel JB, et al. Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis. *Circulation*. 2004;110(15):2216-9.
247. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(7):1161-70. Epub 2004/05/25.
248. Bunting CH. The Formation of True Bone with Cellular (Red) Marrow in a Sclerotic Aorta. *The Journal of experimental medicine*. 1906;8(3):365-76. Epub 1906/05/25.

249. Wong KK, Thavornpattanapong P, Cheung SC, Sun Z, Tu J. Effect of calcification on the mechanical stability of plaque based on a three-dimensional carotid bifurcation model. *BMC cardiovascular disorders*. 2012;12:7. Epub 2012/02/18.
250. Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, et al. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2002;33(5):1214-9. Epub 2002/05/04.
251. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, Thiriet M, Janzen J, Zeller T, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *European heart journal*. 2014;35(23):1515-25. Epub 2014/04/18.
252. Hoshino T, Chow LA, Hsu JJ, Perlowski AA, Abedin M, Tobis J, et al. Mechanical stress analysis of a rigid inclusion in distensible material: a model of atherosclerotic calcification and plaque vulnerability. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009;297(2):H802-10.
253. Oksala N, Levula M, Pelto-Huikko M, Kytomaki L, Soini JT, Salenius J, et al. Carbonic anhydrases II and XII are up-regulated in osteoclast-like cells in advanced human atherosclerotic plaques-Tampere Vascular Study. *Annals of medicine*. 2010;42(5):360-70.
254. Heymann MF, Herisson F, Davaine JM, Charrier C, Battaglia S, Passuti N, et al. Role of the OPG/RANK/RANKL triad in calcifications of the atheromatous plaques: comparison between carotid and femoral beds. *Cytokine*. 2012;58(2):300-6. Epub 2012/03/10.
255. Ozkok A, Caliskan Y, Sakaci T, Erten G, Karahan G, Ozel A, et al. Osteoprotegerin/RANKL axis and progression of coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2012;7(6):965-73.
256. Abedin M, Omland T, Ueland T, Khera A, Aukrust P, Murphy SA, et al. Relation of osteoprotegerin to coronary calcium and aortic plaque (from the Dallas Heart Study). *The American journal of cardiology*. 2007;99(4):513-8.
257. Omland T, Ueland T, Jansson AM, Persson A, Karlsson T, Smith C, et al. Circulating osteoprotegerin levels and long-term prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(6):627-33.
258. Ziegler S, Kudlacek S, Luger A, Minar E. Osteoprotegerin plasma concentrations correlate with severity of peripheral artery disease. *Atherosclerosis*. 2005;182(1):175-80. Epub 2005/08/24.
259. Golledge J, McCann M, Mangan S, Lam A, Karan M. Osteoprotegerin and osteopontin are expressed at high concentrations within symptomatic carotid atherosclerosis. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004;35(7):1636-41. Epub 2004/05/15.
260. Kadoglou NP, Gerasimidis T, Golemati S, Kapelouzou A, Karayannacos PE, Liapis CD. The relationship between serum levels of vascular calcification inhibitors and carotid plaque vulnerability. *Journal of vascular surgery*. 2008;47(1):55-62. Epub 2008/01/08.
261. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92(5):1355-74. Epub 1995/09/01.
262. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet*. 1998;351(9113):1379-87. Epub 1998/05/21.
263. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *The New England journal of medicine*. 1991;325(7):445-53. Epub 1991/08/15.
264. Rerkasem K, Rothwell PM. Systematic review of the operative risks of carotid endarterectomy for recently symptomatic stenosis in relation to the timing of surgery. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009;40(10):e564-72. Epub 2009/08/08.
265. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Fox AJ, Taylor DW, Mayberg MR, et al. Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Lancet*. 2003;361(9352):107-16. Epub 2003/01/18.

266. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1995;273(18):1421-8. Epub 1995/05/10.
267. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 2010;115(8):1549-53. Epub 2009/12/25.
268. Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F, et al. Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology*. 2008;149(7):3688-97.
269. Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(12):2075-80.
270. Maldonado N, Kelly-Arnold A, Vengrenyuk Y, Laudier D, Fallon JT, Virmani R, et al. A mechanistic analysis of the role of microcalcifications in atherosclerotic plaque stability: potential implications for plaque rupture. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;303(5):H619-28. Epub 2012/07/11.
271. New SE, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, et al. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circulation research*. 2013;113(1):72-7. Epub 2013/04/26.
272. Straface G, Biscetti F, Pitocco D, Bertoletti G, Misuraca M, Vincenzoni C, et al. Assessment of the genetic effects of polymorphisms in the osteoprotegerin gene, TNFRSF11B, on serum osteoprotegerin levels and carotid plaque vulnerability. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011;42(11):3022-8. Epub 2011/09/10.
273. Tang Z, Wang A, Yuan F, Yan Z, Liu B, Chu JS, et al. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nature communications*. 2012;3:875.
274. 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;102(21):2636-42.
275. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA, Jr., Orellana MD, Freitas MC, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental hematology*. 2008;36(5):642-54.
276. Zannettino AC, Holding CA, Diamond P, Atkins GJ, Kostakis P, Farrugia A, et al. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *Journal of cellular physiology*. 2005;204(2):714-23. Epub 2005/03/31.
277. Kelly-Arnold A, Maldonado N, Laudier D, Aikawa E, Cardoso L, Weinbaum S. Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(26):10741-6. Epub 2013/06/05.
278. Demer LL. Effect of calcification on in vivo mechanical response of rabbit arteries to balloon dilation. *Circulation*. 1991;83(6):2083-93. Epub 1991/06/01.
279. Goueffic Y, Davaine JM, Merlini T, Rimbert A, Herisson F, Heymann MF, et al. [Arterial heterogeneity]. *La Revue de medecine interne / fondee par la Societe nationale francaise de medecine interne*. 2013;34(1):61-5. Epub 2012/11/20. Arteriopathie et heterogeneite arterielle.
280. Schillinger M, Sabeti S, Dick P, Amighi J, Mlekusch W, Schlager O, et al. Sustained benefit at 2 years of primary femoropopliteal stenting compared with balloon angioplasty with optional stenting. *Circulation*. 2007;115(21):2745-9. Epub 2007/05/16.
281. Leitinger N, Schulman IG. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(6):1120-6. Epub 2013/05/04.

282. Byon CH, Sun Y, Chen J, Yuan K, Mao X, Heath JM, et al. Runx2-upregulated receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in calcifying smooth muscle cells promotes migration and osteoclastic differentiation of macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(6):1387-96. Epub 2011/04/02.

283. Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation research*. 2006;98(7):905-12. Epub 2006/03/11.