

## Table des matières

Résumé.....	III
Summary.....	IV
<b>Table des matières</b> .....	<b>V</b>
Liste des Tableaux .....	VIII
Liste des Figures .....	X
Liste des abréviations et acronymes .....	XIV
Remerciements.....	XXII
Avant-propos.....	XXIV
Introduction :.....	1
Chapitre 1 : Le rétrécissement aortique calcifié (RAC).....	1
1.1 Définition du RAC.....	2
1.2 Étiologie.....	2
1.3 Épidémiologie.....	3
1.4 Les facteurs de risque.....	4
1.5 La valve aortique (VA): Anatomie et structure .....	6
1.5.1 Définition de la VA.....	6
1.5.2 Anatomie et structure histologique la VA.....	7
1.6 Physiopathologie du RAC.....	11
1.6.1 Stress mécanique et dysfonction endothéliale de la VA .....	12
1.6.2 Processus de rétention des lipides dans la VA.....	12
1.6.3 Inflammation et remodelage tissulaire de la VA.....	14
1.6.4 Transition ostéogénique et minéralisation de la VA.....	17
1.6.5 La signalisation phosphate et le système ectonucléotidase et purinergique .....	23
1.6.6 Facteurs qui préviennent la calcification de VA.....	26
1.7 Outils diagnostiques et évaluation de la sévérité du RAC.....	26
1.8 Traitement du RAC.....	28
1.8.1 Remplacement valvulaire aortique (RVA).....	28
1.8.2 Implantation de valve par cathéter.....	29
1.8.3 À la recherche d'une thérapie médicale pour le RAC.....	29
1.9 Les modèles animaux du RAC .....	30
Chapitre 2 : Rôle des lipoprotéines dans le développement du RAC.....	34
2.1 Généralité sur les lipoprotéines.....	35
2.1.1 Les différentes classes de lipoprotéines .....	36
2.1.2 Les lipoprotéines de basse densité (LDL).....	39
2.1.3 Les lipoprotéines de haute densité (HDL) .....	42
2.1.4 Lipoprotéine(a) [Lp(a)] .....	44
2.1.5 Lp(a) et les phospholipides oxydés : implication dans le RAC .....	50
2.1.6 Principales enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines: Rôle dans le RAC .....	56
2.2 L'axe Autotaxine (ATX)-Acide lysophosphatidique (LPA) .....	58
2.2.1 L'autotaxine (ATX).....	58
2.2.2 L'acide lysophosphatidique (LPA) .....	68
2.2.3 Effets physiologiques et physiopathologiques de l'axe ATX/LPA .....	78
2.3 LPA et la voie inflammatoire NF- $\kappa$ B.....	85
2.3.1 La voie inflammatoire NF- $\kappa$ B.....	85
2.3.2 Rôle de LPA dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B.....	95

2.3.3 Implication de la voie NF- $\kappa$ B dans la progression du RAC .....	97
Chapitre 3 : Problématique, Objectifs et Hypothèses .....	99
3.1 Problématique et objectif général .....	100
3.2 Objectifs spécifiques .....	100
3.3 Hypothèse générale .....	101
3.4 Hypothèses spécifiques .....	101
Chapitre 4: Article 1.....	102
Résumé.....	103
Abstract .....	105
Introduction.....	106
Methods.....	107
Results.....	108
Discussion .....	111
Conclusions.....	113
Acknowledgements.....	113
Disclosures .....	114
References.....	115
Tables .....	119
Figures legends .....	123
Figures.....	123
Chapitre 5: Article 2.....	124
Résumé.....	125
Abstract .....	127
Introduction.....	128
Methods.....	128
Results.....	131
Discussion .....	137
Conclusion .....	140
Acknowledgments.....	140
Disclosures .....	140
References.....	140
Tables .....	145
Figures legends .....	148
Chapitre 6: Article 3.....	163
Résumé.....	164
Abstract .....	166
Introduction.....	167
Methods.....	168
Results.....	170
Discussion .....	177
Conclusions.....	179
Acknowledgements.....	180
Conflict of interest .....	180
Reference List .....	181
Tables .....	187
Figures legends .....	193
Chapitre 7: Discussion, Perspectives et Conclusion .....	208

Conclusion générale.....	222
Bibliographie.....	223

# Liste des Tableaux

## Chapitre 1

Tableau 1-1: différents types des CIVs.....	10
Tableau 1-2 : Classification du degré de la sévérité du RAC .....	27

## Chapitre 2

Tableau 2-1 : principales propriétés physicochimiques des lipoprotéines.....	37
Tableau 2-2 : Rôles des différents récepteurs au LPA.....	74
Tableau 2-3 : Rôles pathophysiologiques du LPA .....	79
Tableau 2-4 : Les sites de phosphorylation de p65 et les kinases responsables .....	94

## Chapitre 4

Tableau 4-1: Clinical characteristics of patients.....	120
Tableau 4-2: Univariable and multivariable analyses for calcific aortic valve stenosis (CAVS).....	121
Tableau 4-3: Relationships between ATX and clinical and laboratory variables.....	122

## Chapitre 5

Tableau 5-1: Clinical characteristics of patients for ATX activity.....	145
Tableau 5-2: Clinical Characteristics of Age and Sex-Matched patients .....	146
Tableau 5-3: Clinical Characteristics of patients .....	147

## Chapitre 6

Tableau 6-1: Clinical characteristics of patients for cell cultures.....	187
Tableau 6-2: Clinical characteristics of patients for LDL donors.....	188
Tableau 6-3: Clinical characteristics of patients for qPCR analysis.....	189
Tableau 6-4: Echocardiographic parameters in baseline and IGFII mice.....	190
Tableau 6-5: Echocardiographic parameters in IGFII mice .....	191

Tableau 6-6: Echocardiographic parameters in IGFII mice 9 months.....	192
Tableau 6-7: Assessment of biological parameters in IGFII mice .....	192
<b>Table Annexe</b>	
Tableau annexe 1: Assessment of biological parameters in IGFII mice .....	161
Tableau annexe 2: Echocardiographic parameters in IGFII mice .....	161

# Liste des Figures

## Chapitre 1

Figure 1-1 : Étiologies principales du RAC.....	3
Figure 1-2 : Prévalence du RAC en fonction de l'âge .....	4
Figure 1-3 : Schéma du cœur humain et présentations des quatre valves cardiaques .....	6
Figure 1-4 : Schéma du cœur, vu du dessus avec les quatre valves cardiaques et le faisceau atrioventriculaire .....	7
Figure 1-5 : Coupes schématiques et histologiques des différentes couches de la valve aortique .	9
Figure 1-6 : Résumé de la physiopathologie du RAC .....	17
Figure 1-7 : Principales voies ostéogéniques dans les CIVs.....	20
Figure 1-8 : Mécanisme de la voie NOTCH1 et l'action probable de H19 sur cette voie.....	22
Figure 1-9 : Rôle de l'ectonucléotidase et de la signalisation purinergique dans le RAC .....	25

## Chapitre 2

Figure 2-1 : Structure de base d'une lipoprotéine.....	36
Figure 2-2 : Métabolisme et transport des triglycérides et des lipoprotéines .....	38
Figure 2-3 : Représentation graphique de la composition d'une particule de LDL .....	39
Figure 2-4 : Schéma représentant les mécanismes pathobiologiques par lesquelles les LDLs oxydées favorisent la progression du RAC.....	42
Figure 2-5 : Représentation schématique de la lipoprotéine(a) [Lp(a)] .....	45
Figure 2-6 : Polymorphisme de l'apolipoprotéine(a) .....	47
Figure 2-7 : Métabolisme de Lp(a) .....	49
Figure 2-8 : Schéma représentant le mécanisme pathogénique de Lp(a) .....	54
Figure 2-9 : Schéma représentant les mécanismes potentiels et le rôle causal de Lp(a) et OxPL dans le RAC .....	56
Figure 2-10 : Structure des principaux membres de la famille des ENPPs .....	59
Figure 2-11 : Représentation schématique de l'autotaxine .....	60

Figure 2-12 : Structure des différentes isoformes de l'autotaxine.....	63
Figure 2-13 : Schéma représentant l'acide lysophosphatidique (LPA) .....	69
Figure 2-14 : Les voies de synthèse de LPA.....	71
Figure 2-15 : Les voies de dégradation de LPA .....	72
Figure 2-16 : Représentation schématique des principales voies de signalisation intracellulaires activées par les récepteurs LPA1-6.....	77
Figure 2-17 : Structure des familles NF- $\kappa$ Bs, I $\kappa$ Bs et IKK .....	87
Figure 2-18 : La voie de transduction du signal NF- $\kappa$ B canonique et non canonique.....	89
Figure 2-19 : Les sites de modification dans la sous-unité p65 (RelA) de NF- $\kappa$ B.....	92
Figure 2-20 : La voie d'activation de NF- $\kappa$ B par le LPA.....	96
<b>Chapitre 4</b>	
Figure 4-1: Odds ratio (OR) for CAVS in patients according to ATX activity and Lp(a) (panel A) or OxPL-apoB levels (panel B) .....	123
<b>Chapitre 5</b>	
Figure 5-1: Autotaxin, its substrate (LPC) and product (lysophosphatidic acid) in calcific aortic valve disease .....	153
Figure 5-2: Autotaxin co-localized with Lp(a) in the aortic valve .....	154
Figure 5-3: Autotaxin is expressed by VICs and correlates with indices of tissue remodelling and inflammation of the valve .....	155
Figure 5-4: Lysophosphatidylcholine mediates mineralization by stimulating the NF- $\kappa$ B/IL-6/BMP pathway in VICs.....	156
Figure 5-5: Knockdown of autotaxin blocked LPC-induced inflammatory and mineralizing effects in VICs.....	157
Figure 5-6: Lysophosphatidic acid promotes VICs mineralization .....	158
Figure 5-7: ATX and lysophosphatidic acid in a mouse model of CAVD.....	159
Figure 5-8: Working model for ATX in CAVD .....	160
<b>Chapitre 6</b>	
Figure 6-1: LPA-mediated VIC mineralization depends on BMP2.....	196

Figure 6-2: LPAR1 mediates LPA response in VICs .....	197
Figure 6-3: LPA-induced VICs mineralization relies on the NF- $\kappa$ B pathway .....	198
Figure 6-4: LPA-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway promotes BMP2 expression .....	199
Figure 6-5 : LPA-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway regulates BMP2 promoter activity .....	200
Figure 6-6: LPA-mediated activation of BMP2 relies on phosphorylation of p65 S536 .....	201
Figure 6-7: Role of the ATX-LPAR1 pathway in vivo .....	202

## Figure Annexe

### Chapitre 5

Supplementary figure 1: Relationships between ATX level (dichotomized at the median value) and (a) ox-LDL score (b) CD45 positive cells (c) Lp-PLA2 mRNA levels (d) TNF- $\alpha$ mRNA levels and (e) weight of aortic valve .....	162
--	-----

### Chapitre 6

Supplementary figure 1: siRNA efficiency; qPCR (n=4) (A) and ELISA (n=6) (B) for siRNA against BMP2.....	203
Supplementary figure 2: Confocal images of LPAR1 (n=5) and LPAR3 (n=2) stainings in human VICs .....	203
Supplementary figure 3: siRNA efficiency; qPCR (n=4) (A) and western blot (n=4) (B) for siRNA against LPAR1 .....	204
Supplementary figure 4: qPCR analysis showing the expression of LPAR1 in control non calcified valves versus tricuspid and bicuspid calcified valves.....	204
Supplementary figure 5: A-B) Tiling of epifluorescence images of DAPI staining showing tissue organization.....	205
Supplementary figure 6: NF- $\kappa$ B reporter assay, effect of LPA (10 $\mu$ M) on NF- $\kappa$ B activity in human VICs (n=6).....	206
Supplementary figure 7: BMP2 promoter assay, effect of LPA (10 $\mu$ M) on BMP2 promoter activity in human VICs (n=6) .....	206
Supplementary figure 8: siRNA efficiency; qPCR (n=4) (A) and western blot (n=4) (B) for siRNA against P65 .....	206
Supplementary figure 9: siRNA efficiency; western blots for siRNA against IKK $\alpha$ (n=4) (A) and IKK $\beta$ (n=4) (B) .....	207

Supplementary figure 10: qPCR analysis of Lpar1 and Lpar3 in mouse VICS (n=4) ..... 207

XIII

# Liste des abréviations et acronymes

**ABCA1:** ATP-binding cassette sub-family A member 1

**ABCG1:** ATP-binding cassette sub-family G member 1

**AC:** anhydrase carbonique

**ACE:** angiotensin converting enzyme - enzyme de conversion de l'angiotensine

**ACEi:** angiotensin-converting enzyme inhibitors

**ADN:** acide désoxyribonucléique

**ADP:** adenosine diphosphate

**AGE:** advanced glycation products

**ALP:** alcalin phosphatase

**Alpha-SMA:**  $\alpha$ -smooth muscle actin

**AMPC:** adenosine monophosphate cyclique

**Ang II:** angiotensine II

**AngI:** angiotensine I

**ANOVA:** analysis of variance

**ApoA1:** apolipoprotéine A1

**ApoB:** apolipoprotéine B

**ApoB-100:** apolipoprotéine B100

**ApoE:** apolipoprotéine E

**ARB:** angiotensin II receptor blockers

**ARN:** acide ribonucléique

**ARNm:** acide ribonucléique messenger

**AS:** aortic stenosis

**ASTRONOMER:** Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring the Effect of Rosuvastatin

**ATP:** adenosine triphosphate

**AVA :** aire valvulaire aortique

**AVAi** : aortic valve area index

**AVE** : aire valvulaire effective

**AVR** : aortic valve replacement

**BAV** : bicuspid aortic valve

**BCL10**: B-Cell CLL/Lymphoma 10

**BCL10**: B-cell lymphoma 10

**BMI** : body mass index

**BMP**: bone morphogenic protein

**CAD**: coronary artery disease

**CARMA3**: CARD recruited membrane associated protein 3

**CAVD**: calcified aortic valve disease

**Cbfa1**: core binding alpha-1

**CBP**: CREB-binding protein

**CE** : cellules endothéliales

**CEs** : cellules endothéliales

**ChIP**: chromatin immunoprecipitation

**CIV** : cellules interstitielles de la valve aortique

**CIVa**: cellules interstitielles de la valve aortique activées

**CIVob**: cellules interstitielles de la valve aortique ostéoblastiques

**CIVp** : cellules interstitielles de la valve aortique progénitrices

**CIVq**: cellules interstitielles de la valve aortique quiescentes

**CML**: cellules musculaires lisses

**CMLs** : cellules musculaires lisses

**Coll**: collaborateurs

**CREB**: cAMP responsive element-binding protein

**CRP**: protéine C-réactive

**DAG**: diacylglycérol

**DBP**: diastolic blood pressure

**DEXA:** dual-energy X-ray absorptiometry

**ECA:** enzyme de conversion de l'angiotensine

**eNOS:** endothelial nitric oxide synthase

**ENPP:** ectonucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases

**ENTPD:** ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase

**EPC:** endothelial progenitor cells

**FetA:** fétuine A

**GAGs:** glycosaminoglycans

**GPI:** glycosyl-phosphatidyl-inositol

**GTP:** guanosine triphosphate

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peroxyde d'hydrogène

**HDL:** high-density lipoprotein

**HF/HC:** high fat/high sucrose

**HL:** lipase hépatique

**HMG-CoA:** hydroxyméthyl-coenzyme A

**HPRT:** hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

**ICAM-1:** intercellular adhesion molecule-1

**IDL:** intermediate-density lipoprotein

**IDP:** inosine diphosphate

**IECA:** inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

**IKK :** I $\kappa$ B kinase

**IL-1Ra:** IL-1 Receptor antagonist

**IL-1 $\beta$ :** interleukine-1beta

**IL-2 :** interleukine-2

**IL-6 :** interleukine-6

**IMC:** indice de masse corporelle

**INF $\gamma$  :** interféron gamma

**IP3 :** inositol trisphosphate

**IRM** : imagerie par résonance magnétique

**ITP**: inosine triphosphate

**IκB**: inhibitor of NF-κB

**Ko**: knock-out

**LDL**: low-density lipoprotein

**LDL-C**: LDL-cholestérol

**LDL-ox**: LDL oxydée

**LDLr**: récepteur des LDL

**Lp(a)** : lipoprotéine (a)

**LPA** : Lysophosphatidic acid

**LPC** : lysophosphatidylcholine

**LPL** : lipoprotéine lipase

**Lp-PLA2** : lipoprotein-associated phospholipase A2

**LPS** : lipopolysaccharides

**LVEF** : left ventricular ejection fraction

**MALT1**: mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1

**MAPK**: p38 mitogen-activated protein kinase

**MCP-1** : monocyte chemoattractant protein 1

**MCV** : maladies cardiovasculaires

**MEC** : Matrice extracellulaire

**MEK**: mitogen activated protein kinases- MAPK

**MEKK3**: MAP kinase kinase kinase 3

**MetS** : metabolic syndrome

**MGP** : Matrix Gla Protein

**micro-CT** : microcomputed tomography

**mm** : Hg millimètre de mercure

**MMP** : métalloprotéinase

**NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**NBD** : NEMO-Binding Domain  
**NDP**: nucleoside diphosphokinase  
**NEFA**: Non-esterified free fatty acid  
**NEMO**: NF- $\kappa$ B essential modulator  
**NES**: Nuclear Export Sequence  
**NFATc1**: nuclear factor of activated T-cell  
**NF- $\kappa$ B**: Nuclear factor-kappa B  
**NIK** : NF- $\kappa$ B-inducing kinase  
**NO**: nitric oxide  
**NT5E**: ecto 5'-nucleotidase  
**O<sup>2</sup>** : superoxide  
**OPG**: ostéoprotégérine  
**OPN**: ostéopontine  
**Ox-LDL** : oxidized-LDL (LDL oxydés)  
**Ox-PL** : oxidized-PL (phospholipides oxydés)  
**PA**: phosphatase alkaline  
**PDGF**: Platelet-Derived Growth Factor  
**PG**: proteoglycans  
**Pi**: phosphate inorganique  
**PI3K**: phosphoinositide-3 kinase  
**PKA**: protéine kinase A  
**PKC**: protéine kinase C  
**PLC**: phospholipase C  
**PLC $\gamma$**  : phospholipase C gamma  
**PLTP**: phospholipid transfer protein  
**PPi**: pyrophosphate  
**PrA**: pression artérielle  
**PrAD**: pression artérielle diastolique

**PrAS:** pression artérielle systolique

**q-PCR:** real-time polymerase chain reaction

**RAC:** rétrécissement aortique calcifié

**RANK:** receptor activator of nuclear factor kappa B

**RANKL:** receptor activator of nuclear factor kappa B ligand

**RAS:** renin-angiotensin system

**RhoA:** Ras homolog gene family, member A

**ROCK:** Kinases dépendantes des Rho

**ROS:** reactive oxygen species

**Runx2:** Runt-related transcription factor 2

**RVA:** remplacement valvulaire aortique

**SA:** sténose aortique

**SALTIRE:** Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression

**SBP:** systolic blood pressure

**SD:** standard deviation

**siRNA:** small interfering ARN

**SM:** syndrome métabolique

**SNP:** single nucleotide polymorphism

**SPARC:** secreted protein acidic and rich in cysteine- ostéonectine

**SRA :** système rénine-angiotensine

**STAT:** Signal Transducers and Activators of Transcription protein

**TAD:** transactivation domain

**TCR:** T cell receptor

**TGF:** transforming growth factor

**TGs:** triglycerides

**TIMP:** tissue inhibitor matrix metalloproteinases

**TLR:** Toll-like receptors

**TNF:** tumor necrosis factor

**TNFR1:** tumor necrosis factor receptor de type 1

**TRAF6:** the tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6

**TRAIL:** TNF Related Apoptosis Inducing Ligand

**TRAP:** tartrate-resistant acid phosphatase

**VA:** Valve Aortique

**VCAM-1 :** vascular cell adhesion molecule-1

**VD :** ventricule droit

**VEGF:** vascular endothelial growth factor

**VG:** ventricule gauche

**VICs:** valvular interstitial cells

**VLDL:** very low-density lipoprotein

**Vmax vitesse :** vitesse maximale transvalvulaire

*À ma famille, À ma mère, À mon père*

*Pour leur aide et leur soutien depuis toujours!  
Pour m'avoir toujours appuyé dans mes projets  
Merci pour leurs encouragements perpétuels !*

*À mes sœurs, À tous mes amis*

*Pour le soutien et le support indéfectibles que vous m'avez témoigné*

*« La suprême récompense du travail n'est pas ce qu'il vous permet de gagner,  
mais ce qu'il vous permet de devenir »*

*- John Ruskin –*

# Remerciements

*« Derrière chaque étudiant chercheur se trouve une formidable équipe de recherche ».*

La recherche scientifique nous place souvent face à notre propre ignorance et nos questionnements, les solutions sont quant à elles le fruit de nombreuses rencontres et discussion, d'échanges et de remises en cause.

Tout au long des années de ma thèse, de nombreuses personnes m'ont apporté leur aide, leur soutien et leur générosité. Ces gens ont été impliqués de près ou de loin dans mon développement personnel aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain et à l'avancée de mon projet. J'aimerais donc profiter de cette occasion pour remercier tous celles et ceux qui ont participé à mon cheminement en espérant n'oublier personne.

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon superviseur de recherche **Dr Patrick Mathieu** de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci de m'avoir poussé à me réaliser dans le domaine de la recherche en cardiologie. Merci pour votre collaboration, votre support et finalement, d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance. Merci pour tout!

Je tiens également à remercier les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de réviser et corriger ma thèse.

Tout au long de mes travaux de recherche, j'ai eu la chance et surtout le plaisir de côtoyer des chercheurs de renommée internationale. Je tiens grandement à remercier les Drs **Philippe Pibarot** et **Yohan Bossé** pour leurs suggestions visant à améliorer mes travaux de recherche. Des remerciements vont également au **Dr Benoit J. Arsenault** ainsi qu'au **Dr André Marette**, pour leur aide précieuse dans l'élaboration des diverses expériences composant mon projet de doctorat. Vos commentaires judicieux et vos suggestions m'ont permis de m'engager avec confiance dans mes recherches. Merci à vous tous!

J'aimerais remercier tout particulièrement notre professionnelle de recherche **Marie-Chloé Boulanger**. J'ai passé de belles années au labo avec toi. Tu as toujours été d'une grande aide, surtout avec mes multiples micros questions. Tu n'étais pas seulement une collègue, mais aussi

une amie avec qui j'ai beaucoup ri. Un merci également à **Nathalie Gaudreault** de qui j'ai eu l'honneur de recevoir des conseils stimulants.

Je souhaite également souligner ma reconnaissance envers tous mes collègues. Tout d'abord, un gros merci à **Rihab Bouchareb** pour ta présence énergique, que ce soit lors de mes débuts dans un nouveau labo à Québec ou ailleurs!

Rihab, tu as été une collègue fantastique sans qui bien de ces travaux de recherche n'auraient pas eu lieu et une amie merveilleuse. Je te serai toujours reconnaissant pour ton aide et ton soutien moral lors de mon arrivée au labo!

**Fayez Hadjii**, merci beaucoup pour ton aide précieuse au labo, ton appui dans les moments les plus difficiles. Merci pour ton temps et ta patience durant mon doctorat et merci d'avoir partagé ton expérience. Nous avons vécu tellement de choses ensemble dans les dernières années : rires, joies et peines.

**Rihab et Fayez**, je suis chanceux d'avoir deux amis comme vous dans ma vie. Je n'oublierai jamais rien de notre amitié et même si nous vivons maintenant dans deux pays différents, je sais que je pourrai toujours compter sur vous ! Merci pour tout.

Un grand merci à **AZIZ Dahou**, l'époux de Rihab et docteur en cardiologie. Merci pour ton beau côté naturel et spontané. Ton support et tes suggestions dans la recherche clinique ont enrichi activement ma formation et mon acquisition de connaissances.

Mes remerciements vont également à **Ghada Mkannez et son époux Anis**. Je te remercie Ghada pour ta gentillesse et pour tous tes conseils. Merci pour tout !

Je remercie les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et le Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) pour le soutien financier accordé, soutien qui a servi à m'épauler au cours de mes études de troisième cycle.

Cette section ne pourrait se terminer sans l'expression de ma reconnaissance envers toutes **les membres de ma famille**. En premier lieu, à mes parents, **Akri Ahmed et Elhedi Jalloul** pour leur support quotidien et leur amour infini sans lesquels je ne serais pas qui je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir poussé à apprendre. Merci à mes quatre **sœurs**, vos encouragements tout au long de mon cheminement ont été très appréciés.

Finalement, je tiens aussi à remercier **mes amis, Oussama, Ali et Saber** ! merci pour votre appui moral ! Merci pour tout !

# Avant-propos

Les travaux de recherche inclus dans cette thèse de doctorat ont été effectués au centre de recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (IUCPQ) dans le laboratoire de valvulopathies et pathobiologie des maladies cardiovasculaires du Dr Patrick Mathieu.

Le premier article présenté dans cette thèse de doctorat est intitulé: « **Autotaxin interacts with lipoprotein(a) and oxidized phospholipids in predicting the risk of calcific aortic valve stenosis in patients with coronary artery disease** ». Il a été publié dans la revue « *Journal of Internal Medicine* » en novembre 2016 et l'étudiant en est le premier auteur. Son rôle fut de participer au devis de l'étude, de mesurer les biomarqueurs dans le plasma des patients et effectuer les analyses statistiques. Ensuite, l'étudiant a procédé à l'analyse des données, leur interprétation, la présentation des résultats et la révision du manuscrit. À chacune de ces étapes, l'étudiant a été supervisé par son directeur de recherche le Dr Patrick Mathieu. Ce travail, a été rendu possible grâce à la collaboration de Ablajan Mahmut (étudiant au doctorat avec Dr Patrick Mathieu qui a réalisé le dosage de la masse d'ATX), de Dre Rihab Bouchareb (stagiaire postdoctorale avec Dr Patrick Mathieu qui a participé à la mesurer de l'activité ATX) et de Dre Marie-Chloé Boulanger (assistante de recherche avec Dr Patrick Mathieu qui a participé à l'élaboration des figures du du manuscrit). Le laboratoire de Dr Sotirios Tsimikas (Université de Californie San Diego) a effectué la mesure expérimentale de OxPL-apoB. Ainsi, les Drs Benoit J. Arsenault (CRIUCPQ), Dr Philippe Pibarot(CRIUCPQ), Dr Yohan Bossé (CRIUCPQ), ainsi que Dr Sotirios Tsimikas (Université de Californie San Diego) ont participé à la correction et la relecture du manuscrit final. Le Dr Patrick Mathieu a rédigé le manuscrit initial. Tous les co-auteurs ont participé à la révision du manuscrit.

Le deuxième article est intitulé : « **Autotaxin derived from lipoprotein(a) and valve interstitial cells promotes inflammation and mineralization of the aortic valve** ». Il a été publié dans la revue « *Circulation* » en aout 2015. L'étudiant et le Dr Rihab Bouchareb et Ablajan Mahmut sont tous des *ex aequo* et ils ont contribué de façon égale à ce manuscrit. Ces trois co-premier auteurs ont participé au devis de l'étude, à la planification des expériences, à l'exécution du protocole et les analyses statistiques. Ainsi, ces auteurs ont effectué des études d'immunofluorescence, de

confocal et des immunohistochimies. De plus, ils ont mesuré l'expression des gènes avec PCR en temps réel et effectué la majorité des expériences in vitro (Calcification, transfection des cellules, ELISA et Western Blot). Fayez Hadji, étudiant au doctorat avec Dr Patrick Mathieu, a participé également à la réalisation de certaines expériences sur des cultures cellulaires in vitro. M-H. Laflamme, étudiante à la maîtrise avec Dr Patrick Mathieu, a participé également aux expériences d'immunohistochimie. En outre, la Dre Marie-Chloé Boulanger a effectué l'expérience de *Proximity Ligation Assay* pour étudier l'interaction entre deux protéines dans les tissus valvulaires; elle a aussi participé à l'élaboration des figures du manuscrit. L'étudiant et Ablajan Mahmut ont aussi effectué des tests d'activité enzymatique. Le Dr Arsenault a participé à l'isolement des fractions lipidiques. Les Drs Couture, Trahan et Pagé ont réalisé des analyses histologiques pour le score de remodelage et mesuré le poids des valves aortiques. Les Drs Koschinsky, Romagnuolo et Scipione ont isolé la lipoprotéine Lp (a). Le Dr Pibarot a participé à la supervision des analyses d'échocardiographies. Le Dr Bouchareb a effectué les études sur le modèle de la souris. Les Drs Dahou et Bouchareb ont été impliqués dans la prise des mesures échocardiographiques chez la souris. Dr Murette a participé à la direction des études sur le modèle animal. Le Dr Patrick Mathieu a écrit le manuscrit initial et a guidé tous les travaux de l'étude. Tous les co-auteurs ont participé à la relecture et la révision du manuscrit. Le troisième article est intitulé : « **OxLDL-derived lysophosphatidic acid promotes the progression of aortic valve stenosis through a LPAR1-RhoA-NF- $\kappa$ B pathway** ». Il a été publié dans la revue « *Cardiovascular Research* » en mai 2017 et l'étudiant en est le premier auteur. L'étudiant a planifié et conçu toutes les expériences. Ainsi, il a effectué toutes les expériences in vitro (Calcification, transfection des cellules, ELISA, PCR en temps réel et Western Blot) puis il a mis au point la technique du ChIP. Il a été également impliqué dans les analyses chez la souris. L'étudiant a par la suite procédé à l'analyse des données, leur interprétation, la présentation des résultats et la révision du manuscrit. L'étudiant et la Dre Marie-Chloé Boulanger ont effectué les expériences sur fractions lipidiques isolées. L'isolement de ces lipoprotéines a été rendu possible grâce au Dr Benoit Arsenault et son groupe de recherche. Les Drs Rihab Bouchareb et Khai Le Quang ont été impliqués dans les études sur le modèle de la souris. Ils ont participé principalement à la prise des mesures échocardiographiques chez la souris. De plus, le Dre Ghada Mkannez a contribué étroitement à la récolte des échantillons et à la mesure de certains paramètres, en plus de s'occuper des souris. Le Dr Patrick Mathieu a rédigé le manuscrit initial. Tous les co-auteurs ont révisé le manuscrit et ont fourni des commentaires scientifiques.

**Introduction :**

**Chapitre 1 : Le rétrécissement  
aortique calcifié (RAC)**

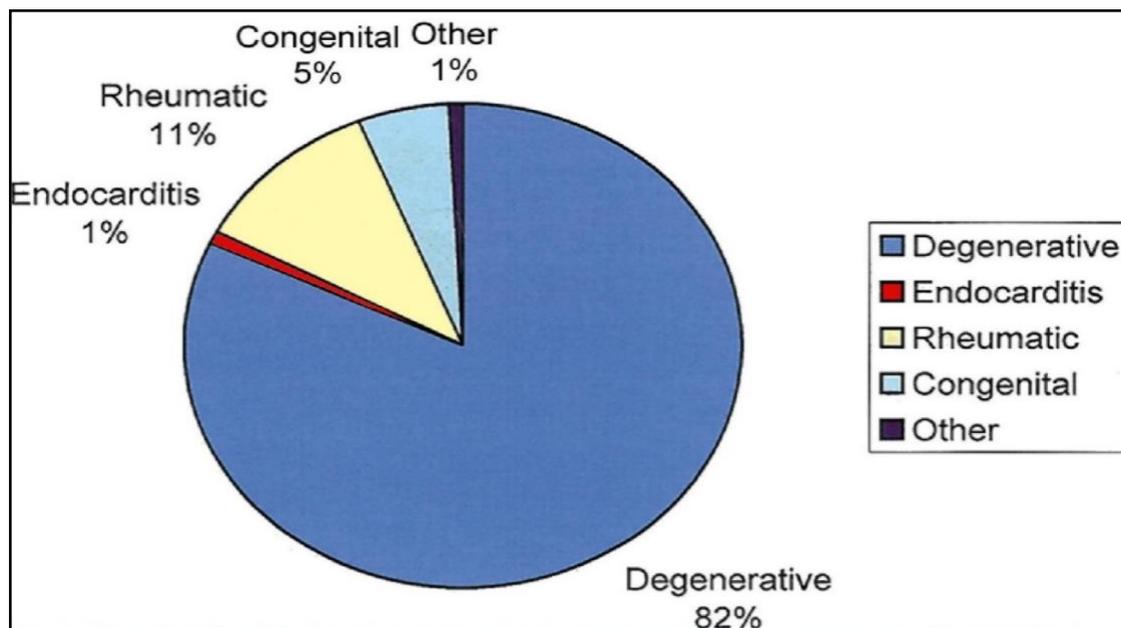
## 1.1 Définition du RAC

Le rétrécissement aortique calcifié (RAC), appelé également sténose aortique (SA), est une valvulopathie caractérisée par un rétrécissement de l'aire valvulaire diminuant ainsi la mobilité de la valve aortique (VA). Ceci entraîne par conséquent une ouverture incomplète de cette dernière et une obstruction du flux sanguin du ventricule gauche vers l'aorte [1,2]. Il s'agit donc d'une maladie progressive passant d'un épaissement des feuillets de la valve à une calcification dystrophique sévère [3]. Les premiers stades de la maladie, nommée sclérose aortique, sont asymptomatiques tant que le rétrécissement ne cause pas de changement hémodynamique. Lorsque la maladie s'aggrave et qu'une obstruction significative d'écoulement sanguin survient, divers symptômes peuvent apparaître chez les patients et le pronostic est très mauvais [4-6]. Les symptômes caractéristiques du RAC sont la dyspnée, l'angor et la syncope [5,7].

## 1.2 Étiologie

À ce jour, il existe trois formes étiologiques du RAC : la maladie rhumatismale, la maladie valvulaire calcifiée et la maladie valvulaire congénitale (i.e. bicuspidie) (Figure 1-1). La forme la plus commune est la sténose aortique d'origine **calcifiante**. Cette forme fréquente est définie comme une maladie d'évolution très lente due à la détérioration et la calcification progressive des feuillets valvulaires [8]. Elle est liée essentiellement au vieillissement et le stress mécanique répétitif que subissent les feuillets au cours du temps. **La maladie cardiaque rhumatismale** est provoquée par une infection des voies respiratoires supérieures (pharyngée). Cette dernière est due à un streptocoque  $\beta$  hémolytique du groupe A qui peut causer éventuellement le développement du rhumatisme articulaire aigu (RAA) [8,9]. Enfin, le RAC peut se développer suite à une **malformation congénitale** de la valve aortique (bicuspidie, unicuspidie ou quadricuspidie) [10]. La bicuspidie valvulaire aortique (BAV) représente 30-50% des valves explantées chirurgicalement pour un RAC sévère [10-12]. La BAV se produit suite à une anomalie de la formation des feuillets aortique lors de l'embryogenèse. Fréquemment, la BAV est due à la fusion des deux feuillets adjacents (entre le feuillet coronarien gauche et droit) pour former un seul feuillet aberrant sous forme d'un raphé qui va subir un épaissement et une calcification [13]. Plusieurs travaux ont démontré que l'apparition de BAV chez plusieurs familles est causée par une mutation

qui affecte la signalisation et la transcription du gène *NOTCH 1* (*NOTCH HOMOLOGUE 1*) [12,14].

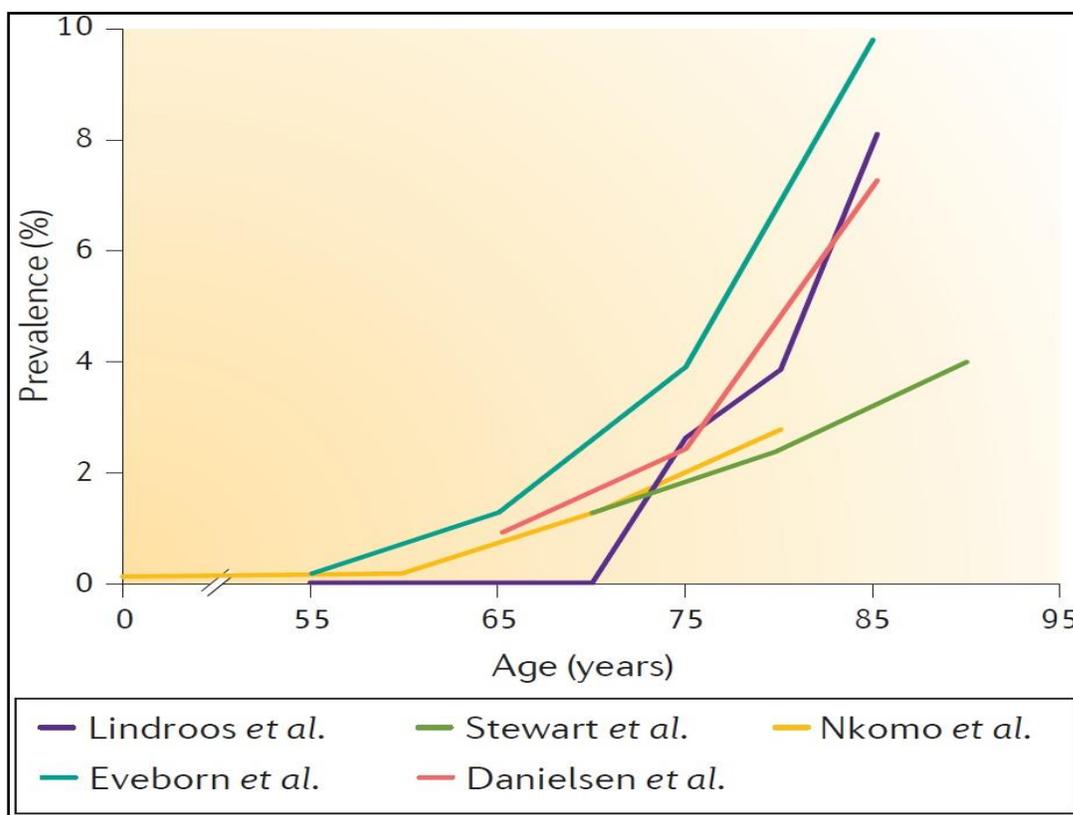


**Figure 1-1:** Étiologies principales du RAC [8].

### 1.3 Épidémiologie

Le RAC est la forme la plus répandue des maladies valvulaires dans le monde entier [15]. C'est la maladie cardiovasculaire la plus fréquente, après la coronaropathie et l'hypertension artérielle dans les pays industrialisés [16-19]. Elle représente la principale cause de chirurgie cardiaque valvulaire responsable d'environ 80 000 remplacements valvulaires aortiques (RVA) et 20,000 décès par année en Amérique du Nord et en Europe [17,20]. La prévalence du RAC est de 2 à 5 % chez les personnes âgées de 65 ans et plus [21,22] (Figure 1-2). En effet, sa prévalence est en augmentation constante compte tenu de la population vieillissante (âgés de 65 ans et plus) dans les pays occidentaux ainsi que l'absence d'une stratégie de prévention pour réduire la progression [1,23,24]. La sclérose aortique est la phase initiale préclinique qui précède le RAC et est caractérisée par un léger épaissement et remodelage de la VA sans qu'il n'y ait une diminution de l'ouverture de celle-ci. Dans les pays développés, ce stade est présent chez 25-30 % des individus âgés de 65 ans et plus [24,25]. Selon une méta-analyse récente, un taux annuel de 1,8 à 1,9 % des patients atteints de sclérose aortique développeront un RAC [25]. Par conséquent, la prévalence du RAC est beaucoup plus faible que celle de la sclérose aortique [22]. Ainsi, il existe

une prédominance masculine dans la manifestation du RAC, où deux patients sur trois sont des hommes [26]. Actuellement, les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'évolution du RAC sont peu connus. Il n'existe à ce jour aucun traitement pharmacologique pouvant retarder ou arrêter la progression de la maladie. Le remplacement valvulaire aortique (RVA) et l'implantation de valve percutanée par cathétérisme constituent les seules thérapies efficaces à la suite d'un diagnostic d'un RAC sévère [27]. Cependant, en Amérique du Nord et en Europe, le coût moyen de chaque RVA est estimé entre 75, 000 \$ à 120, 000 \$ [28,29]. Étant donné que le RAC est considéré comme un problème de santé publique important et un fardeau socio-économique [30], il est impératif d'approfondir nos connaissances sur les principaux mécanismes clés impliqués dans la survenue de cette maladie, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques [24].



**Figure 1-2:** Prévalence du RAC en fonction de l'âge. Tiré de : [24].

## 1.4 Les facteurs de risque

Le RAC partage plusieurs facteurs de risque avec l'athérosclérose. Cependant, cette maladie présente certaines caractéristiques distinctives importantes [31,32]. Bien que 25 à 50% des patients souffrant du RAC n'ont aucune obstruction des artères coronaires [33], ils partagent

pourtant plusieurs facteurs de risques de cette maladie coronarienne. En effet, de nombreuses études ont identifié plusieurs facteurs de risque clinique associés avec le RAC et qui sont similaires à ceux associées à l'athérosclérose notamment, le sexe masculin, le tabagisme, l'hypertension, la dyslipidémie, l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète et des niveaux élevés de lipoprotéine(a) [Lp(a)] [24,34].

En outre, plusieurs études épidémiologiques suggèrent que la prédisposition génétique est impliquée dans le développement du RAC [24, 30,35]. Premièrement, le RAC se développe plus précocement chez les patients porteurs d'une valve bicuspid (bicuspid aortic valve ; BAV) comparativement aux individus ayant une valve aortique tricuspide dite « normale » (tricuspid aortic valve ; TAV) [10, 12,30]. En effet, la valve bicuspid est soumise à des stress mécaniques chroniques plus importants dus à sa morphologie, à l'ouverture incomplète de la valve et au passage du flot sanguin plus turbulent, ce qui pourrait accélérer l'initiation de la maladie par rapport aux patients ayant une TAV. Deuxièmement, des analyses d'association pan génomique (genome wide association study- GWAS) ont démontré qu'un variant génétique (polymorphisme nucléotide (SNP) situé sur le gène *LPA*, codant pour Lp(a), est fortement associé avec les concentrations élevées de Lp(a) et avec le RAC [35]. Des études ultérieures ont répliqué ces résultats et ont également rapporté une association entre les niveaux plasmatiques élevés de Lp(a) et la prévalence du RAC [36-38]. En outre, une autre étude a également démontré qu'un score de risque génétique, qui tient en compte de plusieurs variants génétiques déterminant les niveaux de LDL-cholestérol, est associé avec le développement du RAC [39]. Pris ensemble, ces études récentes de randomisation mendélienne ont révélé une relation causale entre les lipoprotéines de basses densités (LDL) et la Lp(a) avec le développement du RAC. Cependant, trois essais cliniques randomisés avec les statines (SALTIRE, SEAS et ASTRONOMER), qui visent à réduire les niveaux plasmatiques de LDL cholestérol, n'ont pas démontré un avantage significatif sur la progression du RAC [40-42].

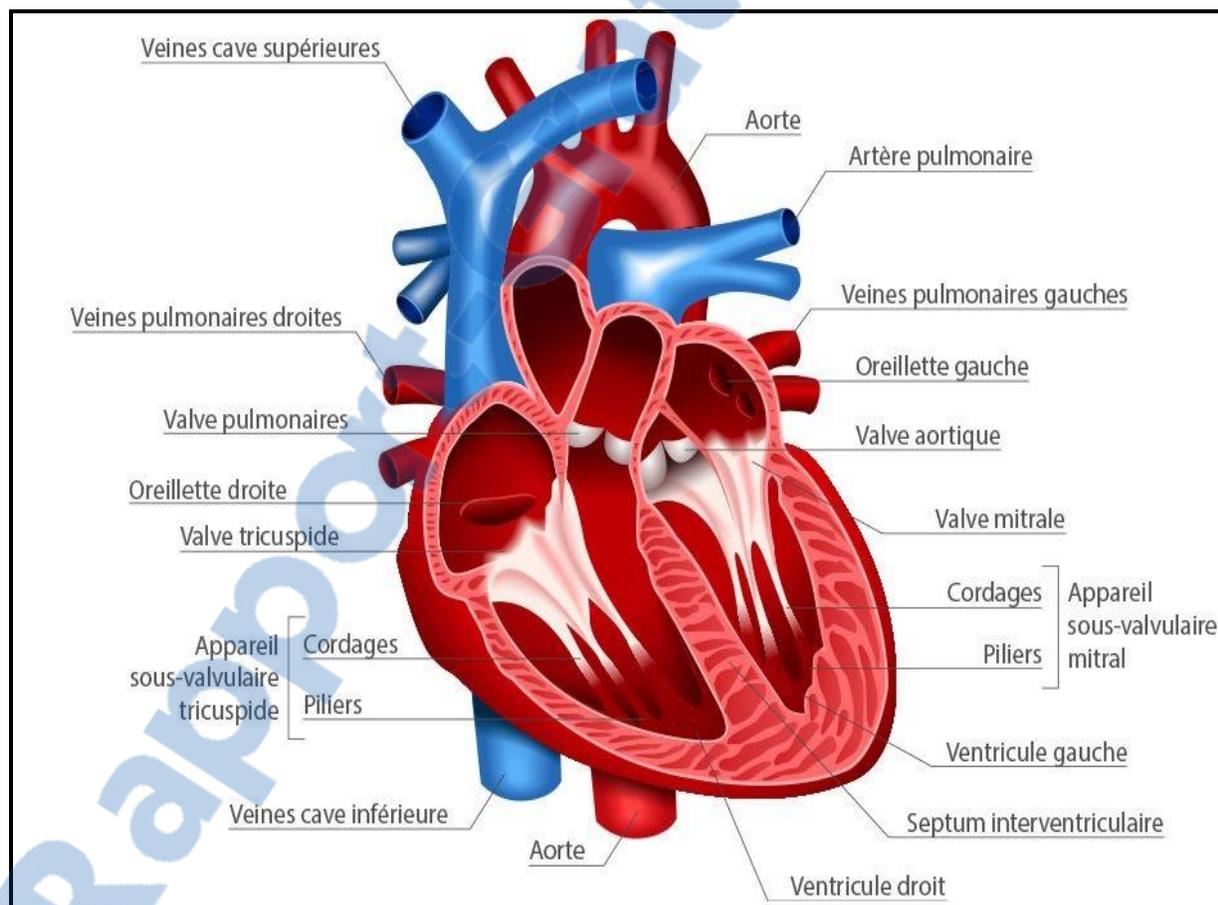
Par ailleurs, certaines études ont permis d'identifier d'autres variations génétiques associées avec le RAC. D'une part, des mutations génétiques sur le gène *NOTCH 1* [14] et *GATA5* (GATA-binding protéine 5) [43,44] ont été associées avec la bicuspidie. Une étude récente d'association génomique a conclu que des variants génétiques situés sur le gène *RUNX2*, un médiateur clé de la différenciation ostéoblastique, et le gène *CACNA1C*, codant pour une sous-unité de canaux calciques voltage-dépendants, ont été associés avec la calcification de la VA [45]. En revanche, malgré l'existence d'une preuve solide de l'héritabilité pour certains cas de

bicuspidie, la structure génétique du RAC est encore mal comprise [46]. Finalement, bien que certains facteurs de risque cliniques et génétiques ont été associés avec le développement et la progression du RAC, jusqu'à ce jour aucune stratégie ne s'est avérée efficace pour le traitement médical de cette maladie [24].

## 1.5 La valve aortique (VA): Anatomie et structure

### 1.5.1 Définition de la VA

Le cœur humain est formé de quatre principales valves qui régulent l'écoulement unidirectionnel du flux sanguin intracardiaque. D'un côté, il existe deux valves semi-lunaires : la valve aortique (VA) et la valve pulmonaire, et de l'autre côté il y a deux valves auriculo-ventriculaires: la valve mitrale et la valve tricuspide. Ces dernières séparent les oreillettes des ventricules et elles sont soutenues par des cordages tendineux. (Figure 1-3).

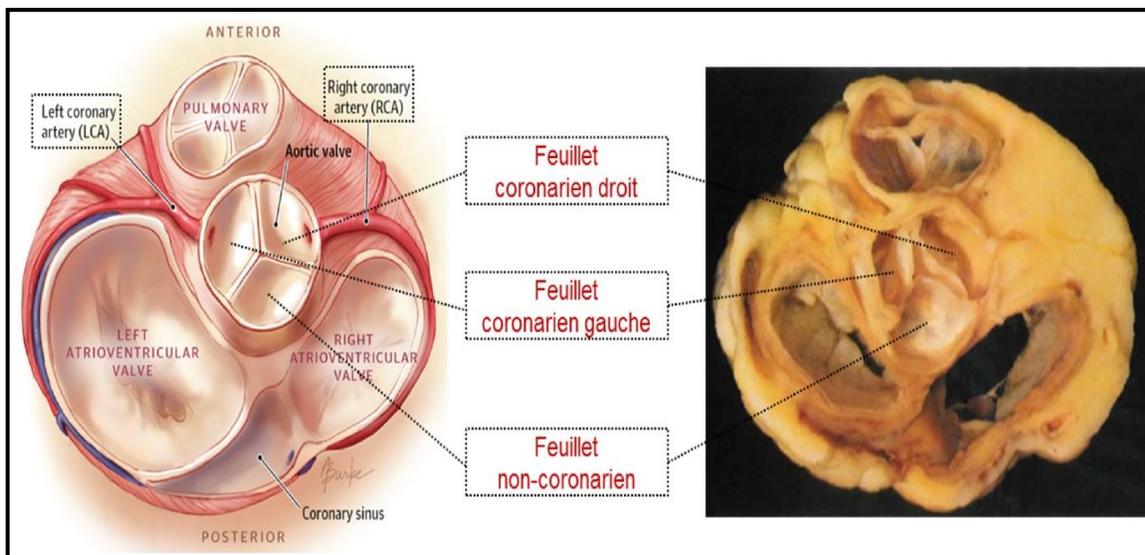


**Figure 1-3 :** Schéma du cœur humain et présentations des quatre valves cardiaques. Tiré de : <https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/cardiologie/generalites-coeur/> .

Dans un contexte sain, lors de la contraction cardiaque, les valves s'ouvrent pour laisser passer le sang de l'oreillette au ventricule ou du ventricule vers l'artère appropriée sous l'effet de la pression et empêchent aussi la régurgitation, c'est-à-dire le retour du sang vers sa cavité d'origine. La VA, constituée de trois cuspidés ou feuillets (tricuspide), est localisée entre le ventricule gauche et l'aorte ascendante [47,48]. Sa fonction est de permettre le passage du sang du ventricule gauche vers l'aorte pendant la systole ventriculaire et d'empêcher le reflux de sang de l'aorte vers le ventricule lors de la diastole ventriculaire [49].

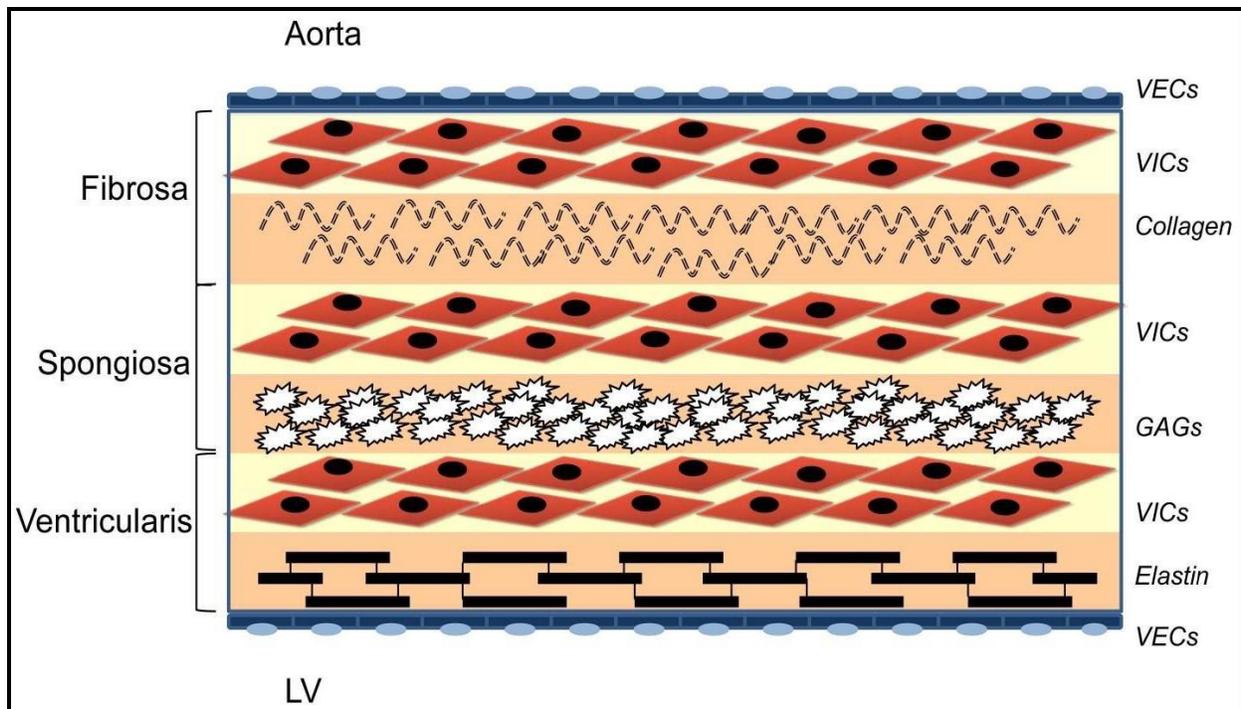
### 1.5.2 Anatomie et structure histologique la VA

Du point de vue macroscopique, la VA liée à la racine aortique est une structure complexe formée de trois éléments principaux: l'anneau valvulaire aortique, les commissures et les feuillets de la VA [50,51] (Figure 1-4). D'une part, chaque feuillet est attaché à l'anneau aortique et d'autre part, il est associé à une dilatation de l'aorte proximale (sinus de Valsalva). [52]. Les trois feuillets, structures capitales de la VA, sont nommés en fonction leur localisation par rapport à l'ostium des coronaires : le feuillet coronarien gauche, le coronarien droit et le non coronarien (ou sinus postérieur) [51,52] (Figure 1-4).



**Figure 1-4 :** Schéma du cœur montrant les quatre valves cardiaques et le faisceau atrioventriculaire. Adapté de [50] et Anderson & Becker, 1982, Anatomy of the heart, Stuttgart, NY. Thieme Verlag.

Du point de vue microscopique et histologique, la VA normale est une structure lisse, mince et transparente. Les trois feuillets qui forment la VA sont caractérisés par une structure semi-lunaire qui détermine les propriétés biomécaniques de la VA [53-55]. Ces feuillets sont composés de **trois couches** caractéristiques distinctes qui contiennent des composantes cellulaires et extracellulaires formées essentiellement par des fibres de collagène, et d'élastine ainsi que par des glycosaminoglycanes [54,55] (Figure 1-5). Les deux couches histologiques les plus externes des feuillets sont formées par **la fibrosa** et **la ventricularis**, qui font face à l'aorte et le ventricule gauche, respectivement. La couche intermédiaire de la cuspside, la **spongiosa**, se trouve entre la fibrosa et la ventricularis. D'abord, **la fibrosa**, la couche la plus épaisse, est riche en fibres de collagène (type I et III) qui sont organisées sur sa périphérie de façon circonférentielle et parallèle à la marge du feuillet [56,57]. Cette architecture confère une forte robustesse à la valve et lui permet de résister aux forces hémodynamiques lors du cycle cardiaque [17,55]. Ensuite, **la spongiosa** est la couche intermédiaire de la cuspside et est principalement riche en glycosaminoglycanes. Elle a pour rôle de faciliter les glissements entre les deux couches externes (la fibrosa et la ventricularis), de résister aux forces de compression exercées par ces 2 couches et d'amortir les chocs durant le mouvement de la VA [55,57]. Enfin, **la ventricularis** est la couche la plus fine. Elle est caractérisée par une faible abondance de collagène et est constituée essentiellement de fibres d'élastine qui sont disposées dans une direction radiale. Cette composition facilite l'ouverture et la fermeture des feuillets et fournit une certaine élasticité et souplesse à la valve lui permettant de supporter les importantes charges dues aux stress hémodynamiques lors du cycle cardiaque [58]. Il est à noter que les trois couches de la VA comprennent principalement deux populations cellulaires : les cellules endothéliales de valve (CEVs) et les cellules interstitielles de valve (CIVs). En premier lieu, les CEVs constituent une fine couche qui tapisse la surface aortique et ventriculaire fournissant donc une interface entre le sang et la VA [59]. Leur rôle est d'assurer le maintien de l'homéostasie valvulaire [51]. En second lieu, les CIVs sont des cellules d'origine mésenchymateuses caractérisées par une plasticité phénotypique importante [60,61]. Ce sont les cellules prédominantes de la VA et qui correspondent à une population hétérogène de fibroblastes [62]. Ces derniers peuvent se différencier *in vitro*, selon un type particulier de milieu de culture, en plusieurs phénotypes cellulaires tels que les cellules ostéoblastiques (osteoblast-like cells), les chondrocytes et les adipocytes [63,64]. On retrouve également une faible population de myofibroblastes et de cellules musculaires lisses (CMLs) (< 5 % de la population) surtout à la base de la couche ventricularis [62-64].



**Figure 1-5 :** Coupes schématiques et histologiques des différentes couches de la valve aortique. VECs : Valve endothelial cells (cellules valvulaires endothéliales) ; VICs : valve interstitial cells (cellules valvulaires interstitielles); collagen : collagène; GAGs : glycosaminoglycans (glycosaminoglycane) ; elastin: élastine; aorta: aorte; LV – left ventricle: ventricule gauche. Tiré de : [55].

### ✚ *Les cellules interstitielles de valve (CIVs)*

Les CIVs produisent la matrice extracellulaire (MEC) et expriment plusieurs enzymes, notamment les métalloprotéinases (MMPs) et leurs inhibiteurs qui régulent le remodelage de la matrice du collagène [60,65]. Ainsi, les CIVs se retrouvent dans les 3 couches valvulaires et jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité et de la fonction valvulaire [60,66]. En premier lieu, à l'état normal (physiologique), les CIVs assurent la réparation des dommages qui se produisent au niveau du MEC [60,65]. Par contre, dans un contexte pathologique comme celui du RAC, ces cellules peuvent se réactiver et se différencier en d'autres lignées cellulaires comme les myofibroblastes. Ces derniers expriment le marqueur de fibres de stress des CMLs, le  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin). De plus, les CIVs peuvent se différencier en cellules ostéoblastiques, ce qui entraîne la calcification de la VA [64, 67,68].

## ✚ Les phénotypes des CIVs

Il existe cinq phénotypes cellulaires différents de CIVs qui peuvent être distinguées selon leurs fonctions spécifiques et en réponse à une lésion (en cas de maladie) : les CIVs progénitrices embryonnaires (cellules endothéliales d'origine mésenchymateuses), les CIVs quiescentes (CIVq) (les plus nombreuses au niveau de la valve adulte), les CIVs activées (CIVa), les CIVs progénitrices (CIVp), et les CIVs ostéoblastiques (CIVob) [17,64,60,69] (Tableau 1-1).

Cell type	Location	Function
Embryonic progenitor endothelial/mesenchymal cells	Embryonic cardiac cushion	Give rise to resident VICs
qVICs	Heart valve leaflets	Maintain physiologic valve structure and function, inhibit angiogenesis in the leaflets
pVICs	Bone marrow, circulation and/or heart valve leaflets	Enter valves or reside in valves to provide aVICs to repair the heart valve
aVICs	Heart valve leaflets	$\alpha$ SMA positive cells that activate cellular repair processes including proliferation, migration, and matrix remodeling
obVICs	Heart valve leaflets	Calcification, chondrogenesis, and osteogenesis in the heart valve

**Tableau 1-1:** Différents types des CIVs. qVICs : CIVs quiescentes; aVICs : CIVs activées; pVIC: CIVs progénitrices et obVIC : CIVs ostéoblastiques. Adapté de [60].

Dans la VA normale, les phénotypes de CIVs changent avec le vieillissement et selon les conditions environnementales [69]. Il est important de noter que l'étape majeure qui initie la formation de la valve pendant l'embryologie est le processus de transformation endothéliale mésenchymale. Ce processus nommé EndoMT (endothelial-to-mesenchymal transition) peut donner naissance à des CIVs [70]. Les CIVs constituent le principal type cellulaire de la VA. Ces

cellules jouent un rôle important dans la réparation et le maintien de la structure valvulaire. Deux populations de CIVs peuvent être distinguées: les fibroblastes et les myofibroblastes. Ces derniers sont caractérisés par l'expression de l'actine du muscle lisse ( $\alpha$ SMA :  $\alpha$  smooth muscle actin) [224, 558]. Une valve saine est composée principalement par des fibroblastes [558], qui sont différents des fibroblastes dermiques [224]. Les CIVs peuvent également synthétiser des composants de matrice extracellulaire (MEC) tels que le collagène, les protéoglycanes et l'élastine [224]. Ainsi, une population clonale de myofibroblastes peut subir spontanément une transdifférenciation phénotypique en cellules ostéoblastiques et former des nodules calcifiés. Ces derniers sont impliqués dans la calcification de la VA [64, 67,68].

Plusieurs gènes impliqués dans le processus d'EndoMT et l'embryogenèse de la VA sont réexprimés durant le développement du RAC [70, 71]. En outre, dans une valve saine et bien développée (adulte), le type cellulaire prédominant est composé de CIVq. Leurs fonctions principales consistent à maintenir une structure et une fonction physiologique normale de la VA. Ainsi, ils inhibent l'angiogenèse et contrôlent la matrice extracellulaire (MEC) dans la VA [60]. En effet, cet effet anti-angiogénique se fait par l'expression de chondromodulin-I, qui neutralise les effets pro-angiogénique de facteurs de croissance tels que VEGF-A [72]. Les cellules CIVa, CIVp et CIVob sont impliquées essentiellement dans la pathogenèse et le développement de certaines maladies. Ces cellules jouent également un rôle important dans la réparation tissulaire (prolifération, la migration, la contraction et le remodelage matriciel). Enfin, les CIVob seront impliquées dans la réponse ostéogénique et la minéralisation de VA [60, 64].

## 1.6 Physiopathologie du RAC

Pendant longtemps, le RAC a été considéré comme un processus dégénératif causé par la détérioration de la VA au fil du temps, et par l'accumulation passive de calcium sur les feuillets [73,74]. Toutefois, depuis plusieurs années, les données cliniques et histopathologiques récentes ont démontré très clairement qu'il s'agit d'un mécanisme physiopathologique complexe. En effet, les études suggèrent que le RAC est une maladie active et multiforme mettant en cause plusieurs processus biologiques tels que le dépôt des lipides, l'oxydation des lipoprotéines, l'inflammation chronique, la transition ostéogénique des CIVs et une minéralisation progressive des feuillets valvulaires [2,24]. En outre, d'autres études d'association génétiques ont mis en évidence une prédisposition génétique à la maladie du RAC [30, 35,36,75,76].

### ***1.6.1 Stress mécanique et dysfonction endothéliale de la VA***

De nombreuses études ont rapporté que la contrainte mécanique (i.e. stress mécanique ou *Shear stress*) est l'évènement déclencheur de lésions initiales de la VA et le début de développement du RAC [77]. En effet, la force exercée par le sang sur la paroi endothéliale à travers les feuillets pendant l'ouverture (systole) et la fermeture de valve (diastole) est appelée contrainte de cisaillement et est connue comme le responsable principal de ces lésions endothéliales. Ainsi, dans les cas de bicuspidie congénitale la contrainte de cisaillement est encore plus prononcée comparativement aux valves tricuspides [2]. Des études sur des BAV ont démontré que le stress mécanique est très élevé au niveau du raphé, une zone caractérisée par une minéralisation abondante durant le RAC [12].

Récemment, notre groupe de recherche a démontré que le stress mécanique favorise la production et l'accumulation de microparticules sphéroïdes minéralisées par les CIVs [78]. Il s'agit donc d'un mécanisme sous-jacent important impliqué dans le RAC. De plus, ils ont démontré que la contrainte mécanique induit la surexpression de l'ectonucléotidase ENPP1, un médiateur important de la minéralisation, d'une manière dépendante de la voie RhoA/ROCK [78]. Par conséquent, la dysfonction endothéliale entraîne une infiltration des lipides et de lipoprotéines circulantes dans la VA, notamment les lipoprotéines de basse densité (LDL). Ces perturbations favorisent également l'entrée des cellules inflammatoires, tels que les lymphocytes T et les monocytes, dans l'espace sous endothélial. Plus tard, dans la VA, les LDLs subissent une oxydation grâce à un environnement pro-oxydant contenant des radicaux libres, des ions métalliques et de l'oxyde nitrique (NO) [80]. Des niveaux élevés de superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ont également été observés dans les VA calcifiées [81].

### ***1.6.2 Processus de rétention des lipides dans la VA***

Plusieurs évidences suggèrent que le dépôt des lipoprotéines dans la VA agit comme un signal de danger. Ceci induit l'inflammation qui mène par la suite à la minéralisation [82]. Cette dernière débute généralement dans la couche de fibrosa où s'effectue l'accumulation des lipides. D'abord, l'accumulation de lipides oxydés a été associée à l'inflammation, à la présence de nodules minéralisés et à la fibrose du tissu valvulaire [83-85]. En outre, les analyses histologiques sur des valves explantées lors d'un remplacement valvulaire ont révélé la présence des LDLs oxydés (Ox-LDLs) dans les VA calcifiées humaines [86,87]. Ces espèces de lipides oxydés étaient

également retrouvées au voisinage de nodules minéralisés [87,88]. À cet égard, des analyses histologiques sur les VA calcifiées ont démontré qu'il existe une codistribution des lipides oxydés avec les apolipoprotéines B, A et E [86,88]. Ceci suggère que ces lipides proviennent essentiellement de la circulation sanguine.

D'autres travaux ont démontré que le niveau des Ox-LDLs dans les tissus de VA est associé avec le taux circulant de particules de LDL petites et denses [83]. Cette quantité élevée de LDL dans la VA a été associée au syndrome métabolique (SM) et à une progression plus rapide du RAC [83,89,90]. De plus, le niveau des Ox-LDLs est associé avec l'inflammation, l'expression de TNF $\alpha$  et le score de remodelage fibrocalcifique de la VA [83,84]. Ainsi, l'oxydation des lipides dans la VA est induite par un niveau élevé des espèces réactives oxygénées ROS (reactive oxygen species) [81, 91-92]. D'une part, l'augmentation des ROS durant la maladie du RAC est reliée au moins en partie au découplage de la voie de l'oxyde nitrique synthase NOS (nitric oxyde synthase) [81, 91]. D'autre part, l'expression de NADPH oxydase est augmentée dans VA calcifiées et contribue à la production des ROS [93]. Par conséquent, le niveau élevé de superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) au voisinage de zones calcifiées pourrait participer à la génération des lipides oxydés qui vont promouvoir une inflammation chronique dans la VA. Par ailleurs, l'expression des protéoglycanes (tels que le biglycan et la décorine) est augmentée dans les VA calcifiées et contribue à la rétention des lipides [94-96]. De plus, de nombreuses études *in vitro* ont montré que les Ox-LDLs et les phospholipides oxydés (OxPLs) favorisent la calcification des CIVs [24]. Également, la Lp(a), une particule LDL dans laquelle l'apolipoprotéine B est liée de manière covalente (par un pont disulfure) à une apolipoprotéine(a), agit comme un transporteur majeur des OxPLs dans la VA [97,98]. À cet égard, des études récentes de randomisation Mendélienne ont révélé la présence d'une association entre les taux élevés de Lp(a) et le développement du RAC [35-37]. En outre, Capoulade et ses collaborateurs ont récemment montré que les niveaux circulant de Lp(a) et OxPLs étaient associés de façon indépendante à une progression plus rapide du RAC [38].

Finalement, des études ont également montré que les particules de LDL petites et denses étaient fortement associées à la Lp-PLA2 (lipoprotein-associated phospholipase A2), une enzyme essentiellement transportée par le cholestérol LDL, mais aussi sécrétée par les macrophages [99,100]. La Lp-PLA2, une enzyme qui produit la lysophosphatidylcholine (LPC) à partir des Ox-PLs, est fortement exprimée dans le RAC [101,102]. De même, le LPC est présent dans les VA calcifiées et agit comme un facteur pro-inflammatoire et procalcifiant [101,103-104]. Il convient

également de souligner que d'autres enzymes, exprimées dans les VA calcifiées, peuvent favoriser la rétention et/ou la modification des lipides. À cet égard, la lipoprotéine lipase (LPL) est surexprimée dans les tissus calcifiés et co-localise avec des lipides oxydés [94]. De plus, la protéine de transfert des phospholipides PLTP (Phospholipid transfer protein) est surexprimée dans les tissus valvulaires calcifiés [95]. Dans l'ensemble, ces études suggèrent que les niveaux élevés de Lp(a) pourraient favoriser l'accumulation de OxPLs dans la VA, qui pourrait à leur tour déclencher une réponse ostéogénique (Figure 1-6).

### ***1.6.3 Inflammation et remodelage tissulaire de la VA***

Outre que l'infiltration lipidique, l'inflammation et la calcification ont été fréquemment observées dans les VA calcifiées humaines [17,86,105]. D'abord, la présence d'un infiltrat inflammatoire dense était associée avec le score de remodelage valvulaire, la néovascularisation et la métaplasie ostéochondrogénique [88,106]. De même, la densité des cellules inflammatoires dans les tissus valvulaires calcifiés était associée à une progression plus rapide du RAC [107,88]. Ensuite, une analyse transcriptomique a indiqué qu'environ 15-20% des gènes différentiellement exprimés dans les VA humains minéralisés sont reliés à l'inflammation [108]. De plus, des hémorragies signalées au niveau des VA calcifiées humaines peuvent contribuer au dysfonctionnement des CIVs en augmentant la charge des ions fer [109]. Pris ensemble, ces évidences suggèrent que le processus inflammatoire est impliqué dans la progression du RAC. En outre, l'infiltration des LDLs dans la MEC et leurs oxydations conduit à une activité inflammatoire intense et une minéralisation ultérieure de la VA [85,110]. En conséquence, les lésions et la rétention des lipides au niveau de la VA mettent en jeu plusieurs cellules caractéristiques de l'inflammation chronique. Ces cellules trouvées dans le tissu valvulaire sont principalement les macrophages, les lymphocytes T et les mastocytes activés [2,77, 95,111]. En effet, les monocytes circulants adhèrent à la couche endothéliale endommagée grâce à des molécules d'adhésion de type E-sélectin, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), puis ils se différencient en macrophages activés [112]. Parmi les macrophages recrutés, certains internalisent des Ox-LDLs et se transforment ensuite en cellules spumeuses [2]. Ces dernières ainsi que d'autres cellules inflammatoires secrèteront plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  (l'interleukine1 $\beta$ ), et le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) [113,114]. Ces cytokines participent par conséquent à l'amplification du processus inflammatoire et provoquent ainsi la minéralisation de la VA. En effet, des études antérieures ont

démontré que le TNF $\alpha$ , un marqueur inflammatoire important, agit via les deux récepteurs TNFR 1 et TNFR 2 (Tumor necrosis factor receptor) pour stimuler la voie inflammatoire NF $\kappa$ B (Nuclear factor- $\kappa$ B) [115,116]. L'activation de cette voie induit l'expression de ses gènes cibles en aval, tels que l'IL-6 (Interleukine-6), IL-8 (Interleukine-8) et IL-1 $\beta$  [117]. À leur tour, ces cytokines activent une réponse ostéogénique et favorisent la minéralisation des CIVs [85]. Par ailleurs, le TNF- $\alpha$  pourrait induire l'apoptose par l'intermédiaire de caspase 8 et 3 provoquant ainsi la minéralisation de CIVs [114,118,119]. De plus, il a été bien démontré que le TNF $\alpha$  favorise le phénotype ostéoblastique des CIVs [85,109]. D'autres travaux ont souligné que le TNF- $\alpha$  promouvait l'expression du gène *MSX2* (muscle segment homeobox homologue 2), un facteur de transcription qui induit la minéralisation de la VA par l'intermédiaire de la voie Wnt [116,121]. Aussi, le TNF- $\alpha$  peut augmenter l'expression du gène *MSX2* via la production de ROS [122].

Par ailleurs, Isoda et ces collaborateurs ont également démontré que les souris déficientes en antagoniste du récepteur d'IL-1 (IL-1Ra<sup>-/-</sup>), une protéine soluble qui se lie au récepteur IL-1R et empêche l'activation de son signal, développent spontanément une inflammation et un épaissement des feuillets valvulaire après 12 mois [117]. Toutefois, le phénotype du RAC a disparu lorsque les souris IL-1Ra<sup>-/-</sup> ont été croisées avec des souris déficientes en TNF- $\alpha$  (TNF $\alpha$ <sup>-/-</sup>). Ces résultats suggèrent que la voie IL-1 $\beta$  passe par le TNF- $\alpha$  et favorise le développement du RAC. Pris ensemble, ces évidences démontrent que le TNF- $\alpha$  joue un rôle important dans l'inflammation et le remodelage de la VA. D'une part, il est intéressant de noter que plusieurs espèces de lipides oxydés peuvent activer la réponse immunitaire innée et entraîner ainsi l'inflammation par l'activation des TLRs (Toll-like receptors). En effet, les TLRs, notamment TLR2 et TLR4, sont surexprimés dans la maladie du RAC et induisent une différenciation ostéogénique des CIVs [96,123]. De ce fait, des études ont démontré que la stimulation de TLR2 avec le biglycan, un agoniste de TLR2 exprimé par les CIVs, promouvait l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et l'expression de PLTP. À son tour, cette enzyme contribue à la rétention des lipides dans l'espace sous-endothélial [95]. De plus, le biglycan et les OxLDLs sont fortement impliqués dans la transition ostéogénique des CIVs par l'intermédiaire de TLR2 et TLR4 [96,124].

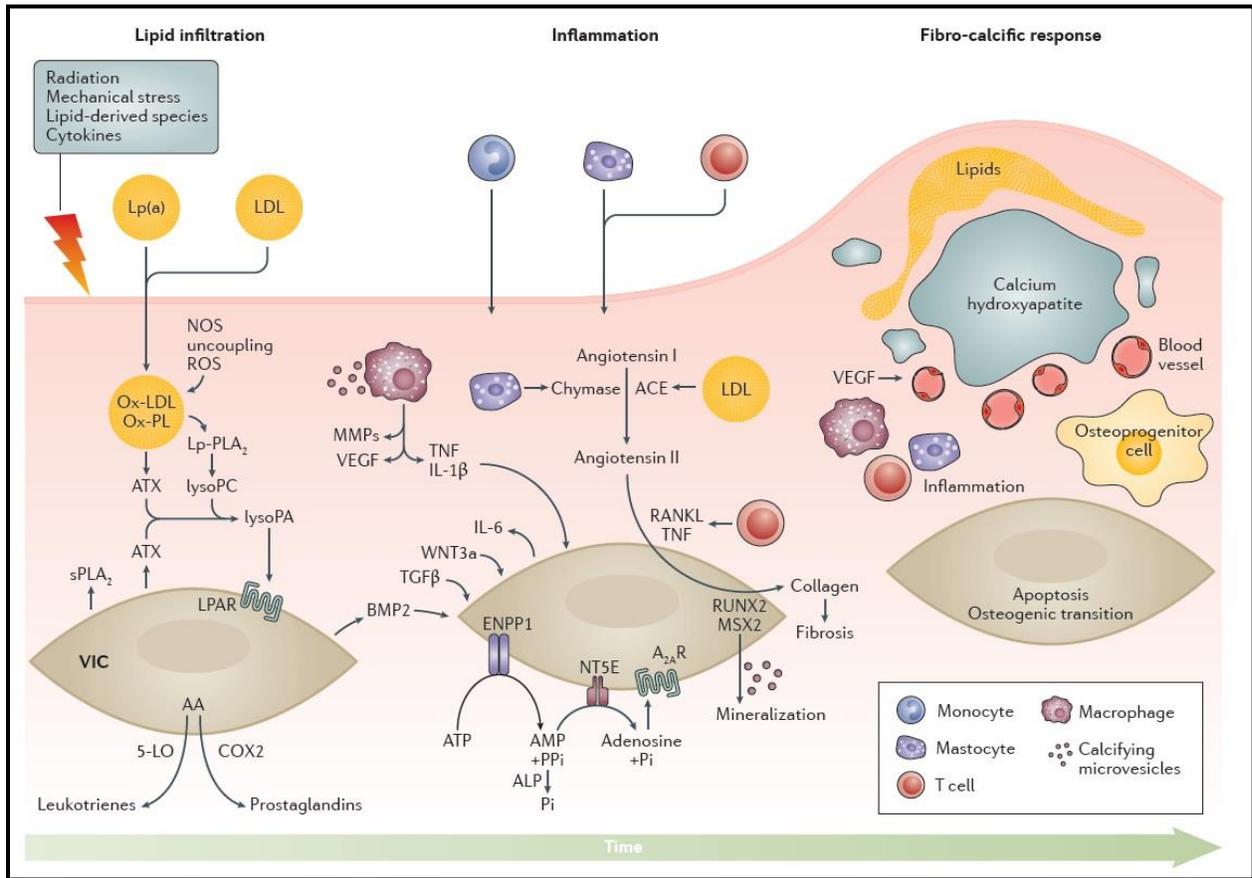
D'autre part, une cible importante de la voie NF- $\kappa$ B, l'IL-6 qui est une cytokine ayant un effet pléiotropique, est fortement exprimée dans les VA calcifiées [125]. Récemment, notre équipe de recherche a montré que la voie NF- $\kappa$ B est activée dans les VA calcifiées humaines et induit la production d'IL-6. À son tour, l'IL-6 agit par un effet paracrine et stimule l'expression du gène *BMP 2* (bone morphogenic protein 2), un morphogène impliqué dans la transition ostéogénique

des CIVs [125]. Compte tenu de son rôle, l'inhibition de l'IL-6 *in vitro* a réduit de façon efficace l'expression de *BMP2* ainsi que la calcification des CIVs [125]. Il convient de noter que l'IL-6 est aussi un facteur impliqué dans la transition endothéliale mésenchymateuse (EndoMT) au niveau de la VA [126]. Conséquemment, il est possible que le processus inflammatoire médié par l'IL-6 favorise le recrutement et la formation de cellules mésenchymateuses ayant des propriétés ostéogéniques au sein de la VA. Toutefois, le rôle de ces cellules dans la pathobiologie du RAC est encore mal connu. Aussi, l'IL 6 induit l'expression de RANK (receptor activator of nuclear factor kappa-B), un membre de la superfamille TNF exprimé par les ostéoclastes [127]. Parallèlement, l'interaction entre RANK et son ligand RANKL (Receptor Activator of NK-κB Ligand) provoque une différenciation ostéoblastique des CIVs, et joue un rôle important dans les processus pro-ostéogéniques [128].

En dernier lieu, plusieurs études ont révélé que les cellules inflammatoires jouent un rôle important dans le remodelage extracellulaire (MEC) de la VA ainsi que dans la prolifération des fibroblastes valvulaires. En effet, les cytokines pro-inflammatoires stimulent la sécrétion des métalloprotéases matricielles MMPs (matrix metalloproteinases) qui sont produites sous forme de pro-enzymes (pro-MMPs) [129,130]. Il a également été démontré que l'IL-1β joue un rôle crucial dans le remodelage tissulaire via l'activation des MMPs [131]. En outre, le TNFα est connu comme un stimulateur de la sécrétion de ces protéinases [132]. De plus, des travaux antérieurs avaient démontré que la stimulation des macrophages avec des Ox-LDLs favorise la sécrétion de plusieurs cytokines inflammatoires. Ces dernières induisent une forte expression des MMPs [130]. Il a également été démontré que MMP2 et MMP9 sont surexprimées dans les VA calcifiées et que leurs niveaux sont associés avec une activité angiogénique. Ces deux protéases sont impliquées principalement dans la fibrose, la rigidité valvulaire et la minéralisation de la VA [133]. En effet, en dégradant les composants du MEC, les MMPs favorisent une production accrue des fragments peptidiques du collagène et d'élastine. Ces éléments conduisent directement à un épaississement des feuillets valvulaires et une infiltration du calcium dans la VA [134,135]. Dans l'ensemble, ces études indiquent que la réponse inflammatoire, la néovascularisation et le remodelage tissulaire semblent contribuer de manière significative au développement du RAC.

Enfin, l'activation du système immunitaire adaptatif joue un rôle dans le RAC, mais elle a été peu étudiée. Néanmoins, certaines études révèlent l'implication de l'immunité adaptative dans le développement des processus physiopathologiques associés au RAC [136]. Sur ce point, une population des cellules T mémoire (cellules T CD3<sup>+</sup> et cellules T circulantes CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup>) est

activée chez les patients avec RAC [137]. En outre, les lymphocytes T CD8+ activés qui expriment à leur surface des récepteurs TCR (T cell receptor) ont été documentés dans les VA calcifiées humaines. Ainsi, des études histologiques sur des valves calcifiées ont révélé la présence de cellules T CD8+ au voisinage de nodules minéralisés et des régions de néovascularisation au niveau des feuillets de la VA [137,138]. Ces données suggèrent également que l'immunité adaptative associée avec l'infiltration lymphocytaire de la VA est activée pendant le RAC.



**Figure 1-6 :** Résumé des facteurs d'initiation, des conditions liées à la progression du RAC et des composantes inflammatoires, lipidiques et phosphocalciques de la physiopathologie du RAC. Adapté de : [24].

### 1.6.4 Transition ostéogénique et minéralisation de la VA

#### ✚ Les cellules impliquées dans la différenciation ostéoblastique

À un stade avancé du processus inflammatoire, les fibroblastes produisent une quantité accrue des fibres de collagène. En effet, au cours de la progression du RAC, un sous-groupe de

fibroblastes se différencie en myofibroblastes valvulaires. Lorsqu'ils seront activés par des cytokines inflammatoires et des Ox-LDLs, les myofibroblastes subissent une transdifférenciation phénotypique et se différencient alors en ostéoblastes « osteoblast-like cells » capables d'induire la formation d'une matrice calcifiée. Cependant, les fibroblastes ne sont pas les seules cellules impliquées dans ce processus, d'autres types cellulaires pourraient servir de base et se différencient eux aussi en ostéoblastes. En effet, des études ont démontré que des cellules endothéliales de la valve mitrale (CEs) pouvaient subir une transformation endothéliale mésenchymale (EMT) et donc, se transformer en cellules mésenchymales capables de déclencher la fibrose et la calcification [126,139].

D'autres études ont aussi démontré que des précurseurs d'ostéoblastes pouvaient infiltrer la VA et subir une différenciation en ostéoblastes actifs [140,141]. Premièrement, il y a les cellules ostéoprogénitrices circulantes qui proviennent de cellules souches (CD34<sup>+</sup>). Ces dernières sont originaires de la moelle osseuse. Les cellules ostéoprogénitrices sont impliquées dans la croissance et la réparation d'os et peuvent reproduire le processus de calcification [142,143].

Ensuite, les cellules myéloïdes calcifiantes (CD33), qui sont dérivées de la moelle osseuse, contribuent également à la calcification de la VA [144]. Il est important de noter que la différenciation vers un type de cellules donné nécessite l'expression de facteurs de transcription spécifiques [559]. Par exemple, l'expression de RUNX2 est nécessaire pour la différenciation ostéoblastique. Ainsi, la différenciation progressive de l'ostéoblaste est caractérisée par l'expression de certains marqueurs ostéoblastiques précurseurs tels que le récepteur de la PTH (PTH-R), la phosphatase alcaline (ALP), le collagène de type I (COLL-I), l'ostéopontine (OP) ou tardifs telle que l'ostéocalcine (OC) [559].

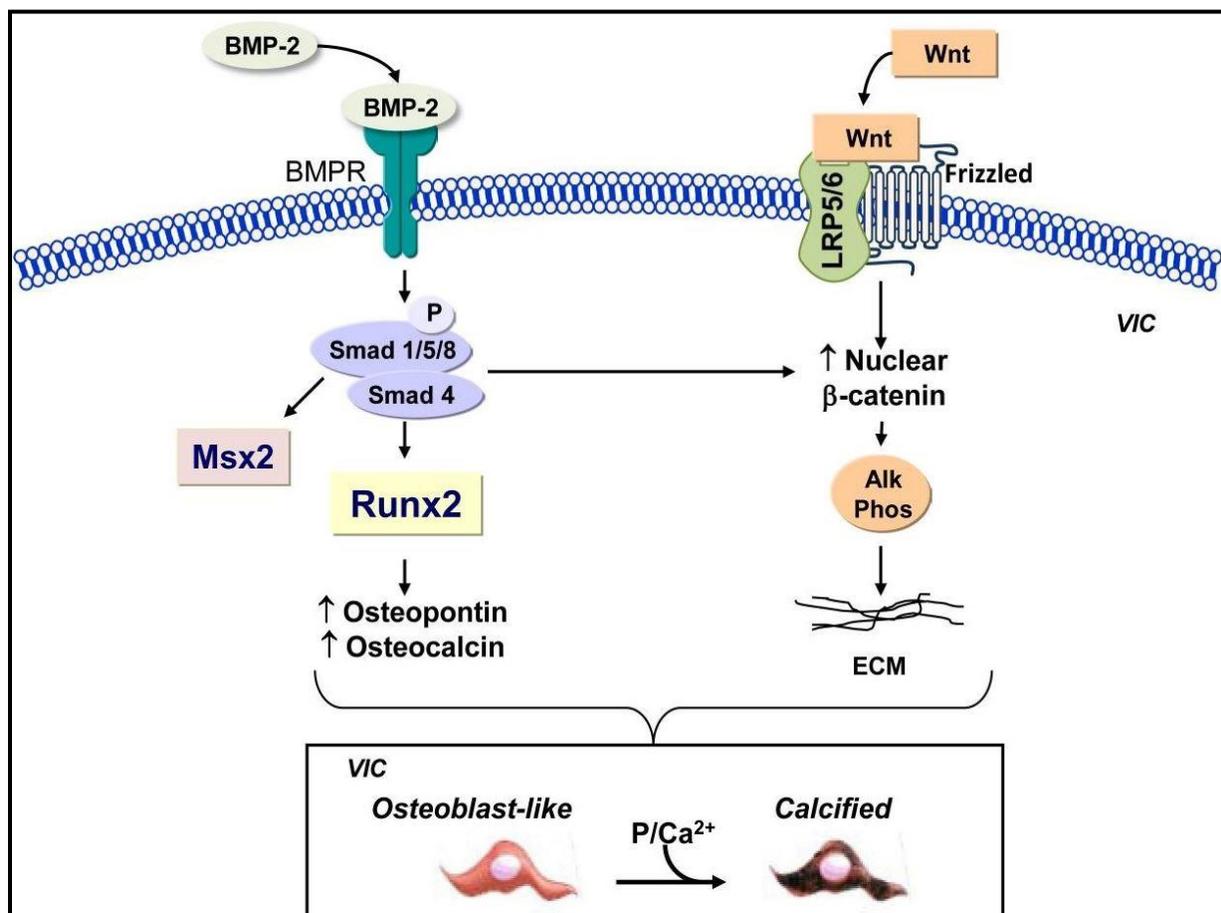
### ***Les principales voies de signalisation pro-calcifiantes***

Les études précédentes ont révélé que cette transition ostéoblastique est essentiellement le résultat de l'activation de plusieurs voies de signalisation calcifiante [145]. Il s'agit essentiellement de la voie Wnt3/Lrp5/ $\beta$ -caténine (wingless-type MMTV integration site family, member 3)/ (LDL receptor-related protein 5-protéine apparenté au récepteur des LDL 5) / $\beta$ -Catenin [11, 146,147] (Figure 1-7). De plus, l'activation d'autres cascades de signalisation pro-ostéogénique, notamment la voie des protéines BMPs [144,145], la voie du TGF- $\beta$  [145,148], la voie de l'angiotensine [149,150] et le système RANK/RANKL [127,145], contribuent de façon active à l'initiation de la minéralisation de la VA et à la progression du RAC. En second lieu, le phénotype ostéoblastique des myofibroblastes favorise l'expression de plusieurs marqueurs ostéoblastiques incluant

l'ostéopontine (OPN) [151], l'ostéonectine, l'ostéocalcine [152], la ténascine C [153], la protéine morphogénique BMP2 [85,144], la phosphatase alcaline (ALP) et le facteur de transcription ostéoblastique RUNX2 [85,154]. À cet égard, les études ont démontré que l'expression de ces marqueurs est augmentée dans les VA calcifiées humaines par rapport aux valves saines [151,154]. Par ailleurs, l'analyse de VA explantées lors d'un RVA a montré que 10 à 15% des valves présentent une métaplasie chondro-ostéogénique [144]. De plus, ces valves sont caractérisées par la présence d'os lamellaire mature avec des éléments hématopoïétiques [144]. Par conséquent, la transition complète des CIVs vers des cellules ostéogéniques se produit au moins dans un sous-groupe de patients durant le développement du RAC.

### ***Rôle de la protéine BMP2 dans la réponse ostéoblastique***

Il est important de noter que dans la maladie du RAC, les BMPs agissent via la voie de phosphorylation des protéines Smad et conduisent ainsi à la surexpression des facteurs de transcription ostéogénique, tels que RUNX2, MSX2 et OSTERIX [155]. Les protéines BMP2 et BMP4, deux membres de la superfamille du TGF, sont les puissants morphogènes ostéogéniques qui régulent la minéralisation de la VA. En fait, BMP2 contrôle la formation osseuse par deux voies : d'une part, BMP2 pourrait activer la voie RUNX2, un régulateur principal de transcription ostéoblastique. À son tour RUNX2 augmente l'expression de protéines liées à la calcification, y compris l'ostéopontine et l'ostéocalcine. Il a été démontré que RUNX2 est surexprimée dans les lésions valvulaires aortiques humaines. Ainsi, l'activation de RUNX2 favorise la calcification via une voie dépendante de BMP2 [111,156]. D'autre part, BMP2 pourrait également induire l'expression d'un autre facteur de transcription, MSX2, par l'activation de voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Catenin. En effet, la protéine Wnt se lie au récepteur Lrp5 et au co-récepteur Frizzled présents sur la membrane extracellulaire des myofibroblastes formant ainsi le complexe Lrp5/Wnt/Frizzled qui déclenche l'accumulation de  $\beta$ -caténine. Ce dernier, une fois stabilisé, subit une translocation vers le noyau où il contrôle l'expression de BMP2 (Figure 1-7). Rajamannan et al. ont documenté l'implication de la voie Wnt3a/ $\beta$ -catenin/Lrp5 dans les VA minéralisées [146,157]. De plus, chez un modèle animal hypercholestérolémique avec RAC, l'expression de  $\beta$ -catenin et Lrp5 était augmentée [146,158]. Prises ensemble, ces études indiquent que les BMPs sont capables d'induire un phénotype de type ostéoblaste chez les CIVs.

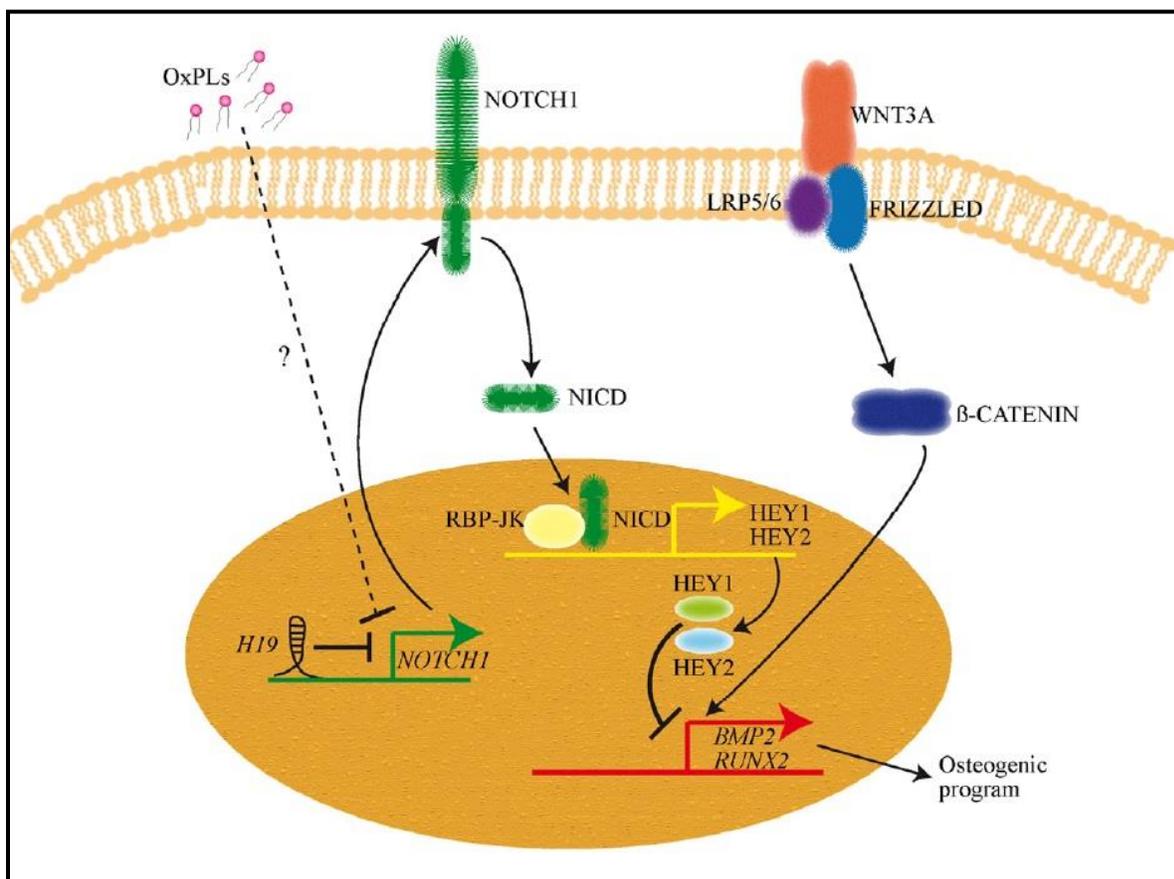


**Figure 1-7 :** Principales voies ostéogéniques dans les cellules interstitielles valvulaires (CIVs) montrant le rôle de la voie BMP2 et Wnt. Adapté de : [55].

### ✚ Rôle de la voie NOTCH1 dans la minéralisation de la VA

Parallèlement aux voies ostéoblastiques décrites ci-dessus, la signalisation NOTCH1 a été également décrite comme une voie majeure impliquée dans le processus de la transition ostéoblastique chez les CIVs. D'abord, NOTCH1 est un récepteur impliqué dans la structuration des tissus pendant l'embryogenèse. En effet, la voie NOTCH1 joue un rôle fondamental dans le processus de développement embryonnaire de nombreux organismes permettant ainsi aux cellules voisines de communiquer entre elles. En 2005, Garg et ses collègues ont révélé que des mutations dans le gène *NOTCH1* étaient associées à la bicuspidie valvulaire (BAV) chez des familles ayant développé le RAC [14,85]. En outre, chez l'homme, des mutations rares dans le gène *NOTCH1* ont été associées avec le développement du RAC chez les patients avec des VA tricuspide (TAV) [159]. Ces études suggèrent que la signalisation NOTCH1 peut jouer un rôle crucial dans le processus de la minéralisation de la VA.

Chez l'humain, quatre récepteurs NOTCH (1-4) interagissent avec cinq ligands Jagged1-2 et delta-like1-3-4 [160]. Lorsque les récepteurs NOTCH sont activés par leurs agonistes (Jagged1-2 et delta-like1-3-4), la partie c-terminal du récepteur appelé domaine intracellulaire NICD (Notch Intracellular Domain) est hydrolysé par la  $\gamma$ -secretase puis libéré dans le cytoplasme. Cette partie cytoplasmique de NOTCH1 (NICD) migre ensuite du cytoplasme vers le noyau où elle interagit avec la protéine RBP-jk (recombining binding protein suppressor of hairless) pour réguler l'expression des gènes cibles [161,162] (Figure 1-8). Garg et al. ont montré que la voie NOTCH1 est essentielle pour la prévention de la minéralisation de la VA [14]. En effet, chez les CIVs lorsque la voie NOTCH1 est activée, le NICD se transloque dans le noyau puis interagit avec des inhibiteurs de la famille Hairy-related (HEY1-2). À leur tour, HEY1-2 répriment l'expression de *BMP2* et *RUNX2* [163]. D'intérêt, NICD pourrait interagir avec la voie Wnt pour contrôler la réponse ostéogénique des CIVs [85,146] (Figure 1-8). Par conséquent, une dérégulation au niveau des cascades de signalisation NOTCH1 et Wnt entraîne une réponse pro-ostéogénique de CIVs [85]. Les souris *Notch1 +/-* sous une diète Western (occidental) développent une calcification de la VA mais présentent une anatomie valvulaire tricuspide [85,164]. En outre, le dysfonctionnement de la signalisation Notch1 dans des modèles animaux ne conduit pas nécessairement à une bicuspidie mais plutôt à une calcification de la VA. Ce processus est dû à l'absence de répression du gène *Bmp2* [164,165]. Pris ensemble, ces études suggèrent que les mutations au niveau de la signalisation NOTCH1 favorisent la transition ostéogénique des CIVs.



**Figure 1-8 :** Mécanisme de la voie NOTCH1 et l'action probable de H19 sur cette voie. Le rôle d'OxPL sur ces voies n'a pas été étudié dans les CIV. Par contre, dans les cellules endothéliales, OxPL a un impact sur NOTCH1 par un processus qui n'est pas complètement élucidé. Adapté de : [109].

### ✚ *Autres acteurs impliqués dans la transdifférenciation ostéogénique*

Outre que la voie Wnt et NOTCH 1, la signalisation de TGF- $\beta$ 1 est également activée dans le RAC. En fait, des études ont montré que TGF- $\beta$ 1 induit une réponse pro-fibrotique et favorise la différenciation ainsi que la calcification des CIVs [145,148]. Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que le système RANK/RANKL/OPG et le système rénine-angiotensine (RAS) sont également des acteurs importants impliqués dans les processus pro-ostéogéniques. Ces voies jouent aussi un rôle crucial dans la régulation de mécanisme de la calcification de la VA. En effet, RANK, une protéine transmembranaire, est un membre de la superfamille TNF exprimé par les ostéoclastes. L'interaction entre RANK et son ligand RANKL, exprimé par les cellules stromales et les ostéoblastes, provoque la différenciation et l'activation des cellules ostéoclastiques [166]. Cette voie RANK-RANKL joue un rôle majeur dans la différenciation et l'activation des

ostéoclastes au niveau des os. En effet, la liaison RANK-RANKL induit la déminéralisation osseuse [167], mais augmente la calcification intravasculaire [168]. Ce système peut être bloqué par l'ostéoprotégérine (OPG), un inhibiteur puissant de la résorption osseuse. Celui-ci agit comme un récepteur soluble qui, en se liant à RANKL, bloque l'interaction entre RANK et RANKL [167,169]. Ainsi, une étude histologique sur des tissus des VA calcifiés a documenté une faible expression de RANK et OPG. Cependant, l'expression de RANKL est augmentée dans les mêmes tissus [110,128]. Weiss et al, ont également démontré que l'administration de l'OPG chez des souris hypercholestérolémiques (Ldlr-/-Apob100/100) prévient la minéralisation de la VA et réduit l'expression des gènes ostéogéniques [170]. En outre, le traitement des CIVs par RANKL induit un phénotype ostéoblastique [128]. Pris ensemble, ces études supportent l'hypothèse selon laquelle une augmentation de RANKL/RANK et une diminution de la concentration d'OPG favorisent la calcification de la VA.

Enfin, d'autres acteurs jouent un rôle prépondérant dans la calcification valvulaire. Premièrement, le stress oxydant intracellulaire et la production des ROS semblent être des éléments physiopathologiques centraux impliqués dans le RAC [81, 92, 171,172]. À cet égard, des niveaux élevés de superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ont été observés dans les valves humaines calcifiées [81]. De même, il a été décrit dans CMLs et des myofibroblastes vasculaires que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) agit comme un inducteur puissant des voies de signalisations ostéogéniques RUNX2 [91] et MSX2/Wnt [122]. Deuxièmement, la ténascine C, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, a été retrouvée dans des zones calcifiées de VA [135]. Des études ont montré que cette glycoprotéine module l'expression de la MMP2, et elle est associée avec la progression du RAC, [135,153].

### ***1.6.5 La signalisation phosphate et le système ectonucléotidase et purinergique***

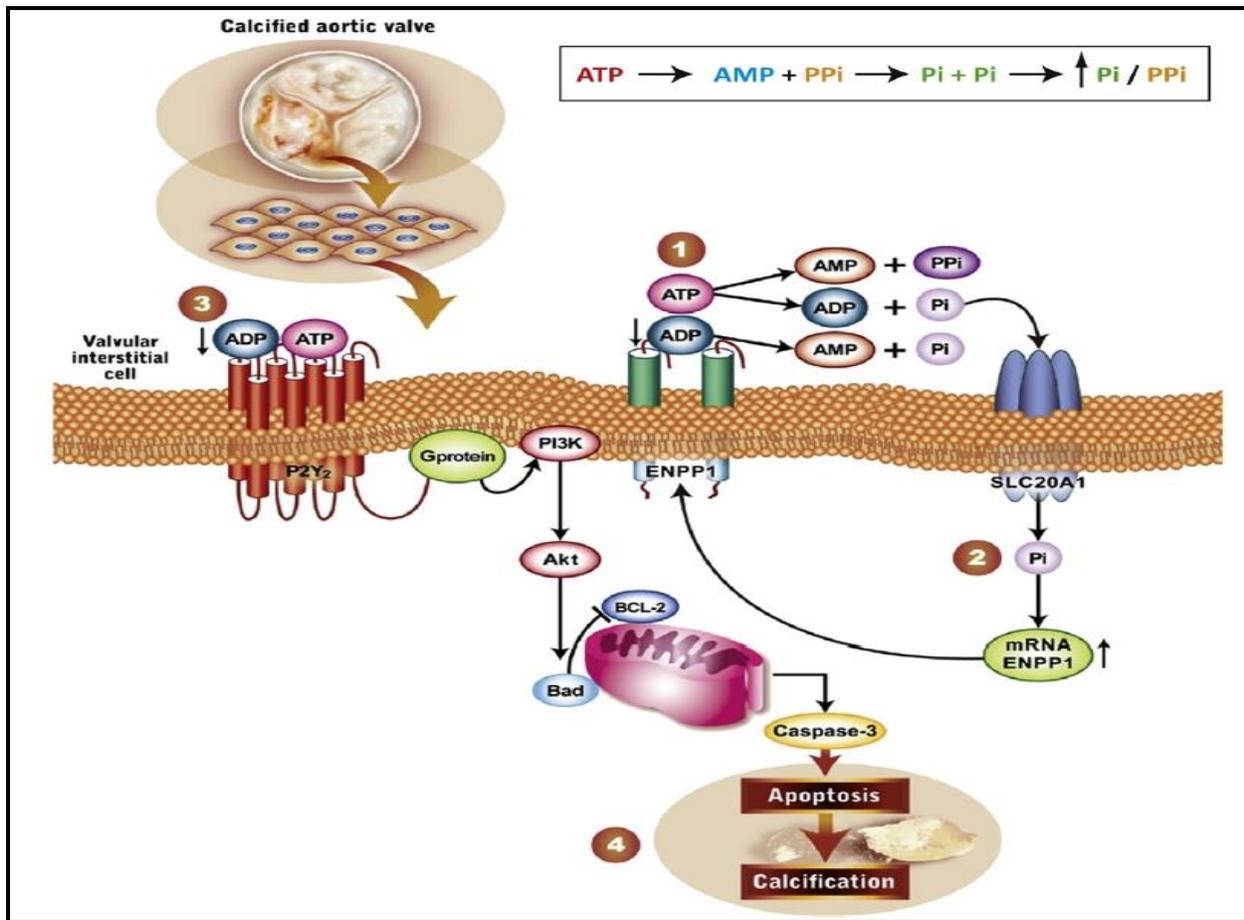
#### ***✚ Rôle des phosphates dans la minéralisation de la VA***

Les nodules de calcium retrouvés dans les VA calcifiées sont majoritairement composés d'hydroxyapatite formée par le calcium et le phosphate inorganique (Pi) [173]. Ainsi, le niveau de phosphate inorganique (Pi), un dérivé de phosphate connu comme un puissant agent prominéralisant, est associé avec le développement du RAC et la calcification valvulaire [174]. À cet égard, la signalisation de Pi possède des propriétés pro-ostéogénique chez les CIVs [175]. D'un

côté, il a été démontré que les patients souffrant d'une insuffisance rénale possèdent un niveau élevé de phosphate circulant. Ce dernier favorise à son tour la calcification vasculaire [176,177]. D'un autre côté, le Pi est transporté à l'intérieure des cellules par des Co-transporteurs de phosphates sodium-dépendants. En effet, El Husseini et al. ont démontré que le cotransporteur type III nommé Pit1 ou SLC20A1 (type III sodium-dependent Pi cotransporter) est surexprimé dans les VA calcifiées [178]. *In vitro*, le cotransporteur Pit1 favorise également la minéralisation des CIVs [178,179]. Par ailleurs, l'inhibition de Pit1 empêche la minéralisation des CIVs induite par le phosphate. Sur ces points, il est important de souligner que les ectonucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (ENPPs) sont des enzymes membranaires qui hydrolysent les nucléotides et les nucléosides extracellulaires pour générer du phosphate et des pyrophosphates [180,181]. Ces enzymes jouent un rôle important dans le contrôle et la régulation de la minéralisation valvulaire [182-183] (Figure 1-9).

### ***Implication des ectonucléotidases et la signalisation purinergique dans la progression du RAC***

D'abord, des travaux récents ont démontré que de nombreuses enzymes, notamment ENNP-1, la phosphatase alcaline (ALP), et la 5'-ectonucléotidase (NT5E/CD73) sont fortement exprimés dans les VA calcifiées, et ils sont impliqués dans la régulation du processus de calcification valvulaire [175,182,185] (Figure 1-9). D'une part, un niveau élevé d'ENPP-1 a été associé avec l'apoptose des CIVs, qui, à son tour, conduit à la minéralisation de la VA [184]. D'autre part, une étude avec une approche de gène candidat a permis d'identifier une association significative entre un polymorphisme nucléotide (SNP) situé dans locus du gène *ENPP-1* et le développement du RAC [183]. L'enzyme ENPP1 hydrolyse l'ATP, sécrétée par les CIVs, en AMP et pyrophosphate (PPi). À son tour le PPi, un inhibiteur puissant de la nucléation de calcium, sera clivé par l'enzyme ALP pour générer le phosphate inorganique (Pi). Il a été démontré que cette enzyme est exprimée en présence de BMP2 et favorise la différenciation des ostéoblastes et le dépôt de calcium [175]. Par ailleurs, l'enzyme NT5E/CD73 utilise l'AMP pour produire l'adénosine qui induit, à son tour, la minéralisation des CIVs via son récepteur A2aR (Adenosine receptor A2a) [186]. Ce dernier augmente l'expression des ectonucléotidases par un mécanisme de rétrocontrôle positif [186].



**Figure 1-9 :** Rôle de l'ectonucléotidase ENPP1 et de la signalisation purinergique dans le RAC. Les nucléotides sont sécrétés par les CIVs et hydrolysés par l'ENPP1 et la phosphatase alcaline (ALP), ce qui augmente le taux de phosphate (Pi) (1). Le Pi pénètre dans les cellules par le biais du transporteur Pi Pit1/SLC20A1, ce qui augmente l'expression de l'ENPP1 dans une boucle de rétroaction positive (2). Un taux élevé d'ectonucléotidases dans le RAC contribue à l'épuisement des niveaux extracellulaires de nucléotides (3). À son tour, la diminution de la signalisation du récepteur P2Y2 diminue la voie Akt et favorise la minéralisation médiée par l'apoptose (4). ADP : adénosine diphosphate; AMP : adénosine monophosphate; ATP : adénosine triphosphate; ENPP : ectonucléotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1; mARN : ARN messenger ; PPi : pyrophosphate; VIC : cellule interstitielle valvulaire. Adapté de : [183].

Aussi, l'hyperactivité des ectonucléotidases dans le tissu calcifié provoque un épuisement de l'ATP extracellulaire et produit l'adénosine ayant une activité ostéogénique puissante [186]. En effet, durant le processus de la minéralisation, la diminution de la signalisation purinergique par le récepteur purinergique P2Y2 est due à une forte activité des ectonucléotidases. En plus, l'ATP extracellulaire, un élément important pour les signaux de survie des CIVs, prévient l'apoptose par le biais du récepteur P2Y2 [183, 186,187]. De plus, l'inactivation de ce récepteur conduit à un phénotype pro-minéralisant des CIVs [125,183]. Pris ensemble, ces constatations suggèrent que la signalisation purinergique est sous le contrôle des ectonucléotidases. Ces dernières jouent un rôle central dans la régulation de la réponse ostéogénique chez les CIVs et la résorption des minéraux dans la VA.

### ***1.6.6 Facteurs qui préviennent la calcification de VA***

En plus des médiateurs pro-calcifiants, la minéralisation valvulaire est régulée par des agents anti-calcifiants connus comme des inhibiteurs naturels de la calcification ectopique. En effet, dans les conditions normales, la présence de certaines protéines qui interfèrent avec la nucléation de l'hydroxyapatite empêchent la minéralisation des tissus valvulaires. Par exemple, la Fétuine A (FetA), une protéine plasmatique abondante sécrétée par le foie empêche la formation de cristaux de calcium-phosphate [188,189]. Des études antérieures ont démontré une association négative entre les niveaux circulants de la FetA et la calcification des valves aortiques et mitrales [190,191]. Ainsi, des faibles concentrations de FetA ont été associées avec une augmentation de la teneur en calcium de la valve et une progression plus rapide du RAC [192]. En outre, la MGP (Matrix Gla Protein), une autre protéine anti-calcifiante, prévient la minéralisation ectopique en bloquant la nucléation de l'hydroxyapatite dans la VA [193-195]. Aussi, la MGP inhibe la minéralisation induite par le morphogène ostéogénique BMP2 en diminuant son action pro-minéralisante [196]. Finalement, ces données suggèrent qu'un déséquilibre entre les facteurs pro-calcifiants et les facteurs anti-calcifiants pourraient jouer un rôle majeur dans le contrôle la calcification ectopique.

## **1.7 Outils diagnostiques et évaluation de la sévérité du RAC**

La méthode de référence la plus fréquemment utilisée pour la prédiction et l'évaluation de la sévérité du RAC est l'échocardiographie-Doppler. Cet outil non invasif est utilisé pour

déterminer le pronostic, le stade d'avancement du RAC et le moment adéquat pour une intervention chirurgicale sur la valve [197]. Les critères d'évaluation standard de la sévérité hémodynamique du RAC reposent sur la vitesse transvalvulaire maximale ( $V_{max}$ ), le gradient de pression transvalvulaire moyen ( $\Delta P_{moy}$ ), l'aire valvulaire aortique (AVA), et l'AVA indexée sur la surface corporelle [198]. Ces mesures permettent de classer le RAC selon le degré de sévérité, soit légère, modérée ou sévère [197] (**Tableau 1-2**).

Variables hémodynamiques	Degrés de sévérité du RAC		
	Légère	Modérée	Sévère
Vélocité maximale (m/s)	2.5-3.0	3.0 - 4.0	>4.0
Gradient transvalvulaire moyen (mmHg)	<20	20 - 40	>40
Aire valvulaire (cm <sup>2</sup> )	1.5-2	1.0 - 1.5	<1.0
Aire valvulaire indexé (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )	>0.85	0.6-0.85	<0.6

**Tableau 1-2 :** Classification du degré de sévérité du RAC.

La  $V_{max}$  mentionnée précédemment est en fait, la vitesse antérograde au niveau de la valve aortique durant la systole (en mètres par seconde). Il s'agit de premier indicateur de la progression et la sévérité du RAC, et elle est considérée comme la mesure clé dans l'évaluation échocardiographique d'un patient avec RAC.

Le **gradient transvalvulaire aortique moyen** est la différence de pression entre le ventricule gauche (VG) et l'aorte, au moment de la systole. Il est calculé à l'aide de l'équation de Bernoulli simplifiée en utilisant les vitesses mesurées en échocardiographie. Donc, le gradient de pression maximal est calculé ainsi :

$$\Delta P_{max} = 4 v_{max}^2$$

L'**aire valvulaire aortique (AVA)** est le troisième paramètre hémodynamique utilisé en pratique clinique pour l'évaluation de la sévérité du RAC [198,199]. Elle est calculée selon l'équation de continuité basée sur le principe de la conservation de masse, c'est-à-dire que le volume de sang passant dans la chambre de chasse du ventricule gauche (CCVG) est égal à celui qui passe à travers l'orifice de la valve aortique.

Donc le calcul de l'AVA se fait selon la formule suivante:

$$AVA = aire_{CCVG} \times ITV_{CCVG} / ITV_{aorte}$$

Où l'aire  $CCVG$  est l'aire de l'anneau de la valve aortique calculé à partir du diamètre de la  $CCVG$ ,  $ITV_{CCVG}$  est l'intégrale temps-vélocité mesurée dans la  $CCVG$  et  $ITV_{aorte}$  est l'intégrale temps-vélocité mesurée dans l'aorte.

**L'aire valvulaire aortique indexée par la surface corporelle (AVAi)** est un autre critère important qui peut estimer la sévérité du RAC [199]. Il permet d'obtenir l'aire effective d'ouverture de la valve aortique, mais corrigée pour la surface corporelle [199]. En effet, un RAC est jugé sévère si la valeur de l'AVAi est en deçà de  $0,6\text{cm}^2/\text{cm}^2$  [200].

Outre que l'échocardiographie-Doppler, il existe d'autres méthodes qui permettent de confirmer le stade de sévérité de la maladie, notamment la tomographie et le bilan hémodynamique par cathéter.

## 1.8 Traitement du RAC

Il n'existe à ce jour aucun traitement pharmacologique permettant de ralentir ou stopper la progression du RAC. Depuis longtemps, la seule thérapie envisageable lorsqu'un patient atteint un stade sévère de la maladie était la chirurgie de remplacement valvulaire (RVA) par sternotomie. Cependant, depuis peu d'autres techniques de RVA moins invasives sont mises en pratique [27]. Le RVA (chirurgical ou par la voie percutanée) demeure la meilleure alternative thérapeutique pour les adultes avec RAC [201-203].

### 1.8.1 Remplacement valvulaire aortique (RVA)

Une chirurgie est disponible pour les patients souffrant d'un RAC sévère symptomatique et consiste à remplacer la valve native de l'individu soit par une prothèse mécanique ou biologique. Bien qu'il y ait des risques de mortalité associés à cette opération et des probabilités de complications liées à la prothèse de 2% par année [204], les patients qui subissent un RVA ont des taux de survie d'environ 80% et 70% après 5 et 10 ans, respectivement [205]. En revanche, la mortalité associée au RVA a diminué drastiquement dans les deux dernières décennies. [206]. Les deux types de prothèses ont des avantages et des inconvénients [203]. Alors que la prothèse mécanique nécessite une anticoagulothérapie constante du patient, elle offre une durée de vie beaucoup plus longue. Par contre, la prothèse biologique (porcine ou bovine) est sujette à la dégénération et la calcification une fois implantée chez le patient [102]. Elle peut nécessiter une seconde opération afin de changer la bioprothèse quelques années plus tard [207].

### ***1.8.2 Implantation de valve par cathéter***

Une nouvelle technique de remplacement valvulaire moins invasive est actuellement mise en place pour les patients vulnérables et pour qui une chirurgie comme le RVA est contre-indiquée : l'implantation par cathéter. Cette technique permet d'implanter une valve par une approche trans-fémorale ou trans-apicale chez des patients pour qui le RVA par sternotomie n'est pas envisageable.

### ***1.8.3 À la recherche d'une thérapie médicale pour le RAC***

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement médical capable de ralentir la progression du RAC. La maladie du RAC partage plusieurs similitudes avec l'athérosclérose en termes de facteurs de risque associés. Étant donné que l'hypercholestérolémie est mise en cause dans les deux maladies [24,34,109], il a ainsi été supposé que l'utilisation des médicaments destinés à diminuer le taux de cholestérol et utilisés pour le traitement de l'athérosclérose, tels que les statines, puisse ralentir ou prévenir la progression du RAC [2,24,202]. En effet, dans ces études précédentes, les statines qui ont été utilisées visent à réduire le taux de cholestérol en inhibant l'hydroxyméthyl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase [208]. Aussi, les statines peuvent induire une plus grande captation des LDL par le foie en augmentant le nombre de leurs récepteurs [109]. Ce concept d'utilisation des statines afin de ralentir progression du RAC a été soutenu par des études expérimentales utilisant des modèles animaux de SA. En effet, l'administration d'atorvastatine chez le lapin hypercholestérolémique a prévenu le développement du RAC [157,209,216]. Également, quelques études cliniques rétrospectives ont observé une progression plus lente du RAC chez les patients traités par des statines [210,211]. D'intérêt, l'étude RAAVE (Rosuvastatin Affecting Aortic Valve Endothelium) a été réalisée pour évaluer l'impact d'un traitement avec les statines chez les patients atteints du RAC. En effet, en se basant sur les valeurs hémodynamiques mesurées par échocardiographie, cette étude a démontré que la rosuvastatine ralentit la progression du RAC [212]. Cependant, trois essais cliniques randomisés ont démontré que l'administration des statines n'avait aucun effet sur la progression du RAC [109, 212,213].

Une autre voie thérapeutique envisageable pour diminuer ou prévenir la progression de RAC a fait émergence: celle des inhibiteurs du système rénine-angiotensine (SRA), plus particulièrement, les IECA (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) ou les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II (BRA). Dans un modèle de lapin hypercholestérolémique, l'administration

d'olmesartan, une molécule de la famille des ARA, prévient le développement du RAC. En effet, ce médicament prévient l'accumulation des myofibroblastes et des ostéoblastes. Il agit aussi en diminuant l'expression d'ostéopontine, RUNX2 et l'IECA [214]. De plus, une étude rétrospective rapporte que l'utilisation d'IECA est associée à une plus faible accumulation de calcium dans la VA [215]. Néanmoins, des essais cliniques randomisés sont encore nécessaires pour vérifier l'efficacité de l'inhibition du système rénine-angiotensine sur la prévention de la progression du RAC [202].

## 1.9 Les modèles animaux du RAC

Afin de mieux caractériser la maladie du RAC, les travaux de recherches et les essais pré-cliniques de nouvelles thérapies nécessitent des modèles expérimentaux pour mieux comprendre la pathogenèse de cette maladie. En effet, les modèles animaux développés jouent un rôle crucial dans l'étude de l'initiation et la progression du RAC *in vivo* [219]. Ils sont également utiles pour valider l'efficacité des interventions thérapeutiques. Cependant, chacun de ces modèles animaux ne reproduit pas tous les aspects pathologiques humains. Donc, pour être plus efficaces, ces modèles devraient imiter la maladie et les conditions dans lesquelles le RAC humain se développe. Les espèces les plus fréquemment utilisées pour modéliser le RAC sont les souris, le lapin et le porc [157, 209, 216-219]. Dans les études sur le RAC, la majorité des travaux animaux sont réalisés chez des modèles de souris, car celles-ci sont particulièrement adaptées aux études de différents mécanismes présents durant la pathogenèse du RAC [17,145]. Les modèles de souris offrent un certain nombre d'avantages, y compris leur petite taille, leur facilité d'élevage et leur rentabilité. En outre, le faible temps de génération, la facilité des manipulations génétiques et la disponibilité des échantillons clonaux permettent une étude spécifique des principaux médiateurs moléculaires du RAC [220, 221]. Les modèles de souris peuvent être subdivisés en deux catégories distinctes : un modèle dyslipidémique et un modèle non dyslipidémique.

### **Modèle de souris dyslipidémiques**

Le modèle de souris dyslipidémiques est le modèle murin le plus couramment utilisé pour étudier la pathologie valvulaire aortique [219]. Il comprend principalement les souris déficientes pour le récepteur des LDL (souris *Ldlr*<sup>-/-</sup>) et les souris déficientes en apolipoprotéine E (*ApoE*<sup>-/-</sup>)

#### ❖ Les souris Ldlr<sup>-/-</sup>

Étant donné que les souches de souris WT (Wild-Type) ne développent pas spontanément une calcification valvulaire, des insultes alimentaires et/ou génétiques sont souvent employées [222]. Premièrement, Weiss et al. ont étudié le modèle de souris hypercholestérolémique déficientes pour le gène Ldlr et qui expriment seulement l'apolipoprotéine B (Ldlr<sup>-/-</sup>; ApoB<sup>100/100</sup>) [217]. En effet, à l'âge de 20-24 mois ces souris développent spontanément une hypercholestérolémie légère (~ 270 mg /dL), une réduction de l'AVA (> 50%), une diminution de la fraction d'éjection et une hypertrophie ventriculaire gauche [217]. Ainsi, le vieillissement de ces souris est associé à un stress oxydatif accru et une calcification de la VA [217]. Miller et al. ont également développé un modèle de souris Reversa (Ldlr<sup>-/-</sup>/ApoB<sup>100/100</sup>/Mttp<sup>fl/fl</sup>/Tg(Mx1-Cre)) pour étudier les effets d'un traitement hypolipidémique sur la progression du RAC [223]. En effet, le *knock-out* conditionnel au niveau du gène qui code pour la protéine de transfert des triglycérides microsomaux (Mttp) a permis de réduire les taux de cholestérol sériques (l'hypercholestérolémie) chez les souris Reversa. Le gène Mttp est important dans la production des lipoprotéines contenant de l'apoB. Son inactivation réduit énormément la sécrétion de l'apoB [223]. De façon intéressante, la perte de l'activité Mttp médiée par le Cre après six mois ("reversal") rétabli les taux de cholestérol à un niveau normal, diminue le dépôt lipidique valvulaire et l'infiltration des macrophages, empêche la calcification et réduit le stress oxydatif [223]. Ainsi, elle entraîne une suppression des voies de signalisation pro-ostéogénique telles que MSX2, RUNX2 et pSmad1/2 [219, 223].

#### ❖ Les souris ApoE<sup>-/-</sup>

En plus du modèle Ldlr<sup>-/-</sup>, les souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>) développent également un RAC mais de façon tardive [225]. Ces souris développent une hypercholestérolémie associée à une augmentation de la vitesse transvalvulaire, de la régurgitation aortique, l'infiltration des macrophages et des cellules T, et la calcification nodulaire [255]. En 2007, Aikawa et al. ont également constaté que les souris ApoE<sup>-/-</sup>, âgées de 30 semaines et qui ont reçu une diète athérogénique pendant 20 semaines, présentaient un épaissement au niveau de leur VA ainsi que des nodules de calcium [226].

#### ❖ Les souris LDLR<sup>-/-</sup> ApoB<sup>100/100</sup>/IGFII

Actuellement il y'a aucune thérapie pour freiner la progression du RAC ou stimuler la régression de la calcification. Ceci est relié entre autres à l'absence d'un modèle animal qui serait comparable à la physiopathologie humaine. Les souris déficientes pour le récepteur à LDL et exprimant

uniquement l'apolipoprotéine B100 (LRKOB100) développent le RAC après 20 mois. C'est uniquement le tiers de ces souris qui ont une évidence échocardiographique d'avoir un RAC. Dans notre laboratoire, nous avons utilisé les souris  $LDLr^{-/-}/ApoB^{100/100}/IGFII$  (LRKOB100/IGF), un modèle qui combine l'athérosclérose et le syndrome métabolique [227, 187]. Dans ce modèle diabétique, IGFII est surexprimé dans les cellules bêta pancréatiques provoquant ainsi une hyperplasie du pancréas et une hypersécrétion d'insuline [293]. Ces souris développent un diabète de type 2 comme conséquence à cette hyperinsulinémie. Au début, ce modèle a été caractérisé pour étudier la calcification des lésions athérosclérotiques. Nous avons déjà démontré qu'une durée de 6 mois de régime HFS (high-fat, high-sucrose), donc riche en gras et en sucre, est suffisant pour que ces souris développent une sténose aortique (80% vs 33%) [227]. En effet, ces souris ont une augmentation de la vélocité transvalvulaire (172 vs 144 cm/s). Le modèle  $LDLr^{-/-}/ApoB^{100/100}/IGFII$  représente un phénotype physiopathologique semblable à la maladie humaine, hyperglycémie à jeun et hypercholestérolémie. Néanmoins, les patients atteints d'une sténose aortique n'ont pas tous une intolérance au glucose ou une dyslipidémie. De plus, nos analyses histologiques sur le tissu de valve de ces souris, ont révélé la présence de cristaux d'hydroxyapatite et de la fibrose comme chez l'humain [227, 187]. Donc, ce modèle est prometteur pour mieux comprendre les mécanismes menant à la calcification de la VA.

### **Modèles non dyslipidémiques**

En plus de ces deux modèles hyperlipidémiques communs, il existe d'autres modèles génétiques intéressants qui récapitulent certains aspects du RAC.

**1) Les modèles de bicuspidie :** Ces animaux ont largement été utilisés pour tenter de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la BAV. Rajamannan et al. ont démontré que les souris  $eNOS^{-/-}$  développent une BVA (près de 30%) et présentent un RAC après 23 mois de diète riche en graisse [228] [43].

**2) Le modèle de souris inflammatoire ( $IL-1Ra^{-/-}$ ) :** une étude faite par Isoda et al. a démontrée que les souris déficientes en antagoniste du récepteur d'IL-1 ( $IL-1Ra^{-/-}$ ) développent une inflammation et un épaississement des feuillets valvulaire après 40 semaines [117]. Les taux circulants de  $TNF-\alpha$  ont été augmentés considérablement dans ce modèle.

**3) Le modèle de souris hyperphosphatémique ( $Klotho^{-/-}$ ) :** Les souris déficientes pour la protéine de vieillissement et d'interaction de FGF-23 nommée Klotho présentent des calcifications vasculaires et de l'ostéopénie [229, 230]. Ainsi, les souris  $Klotho^{-/-}$  exhibent une

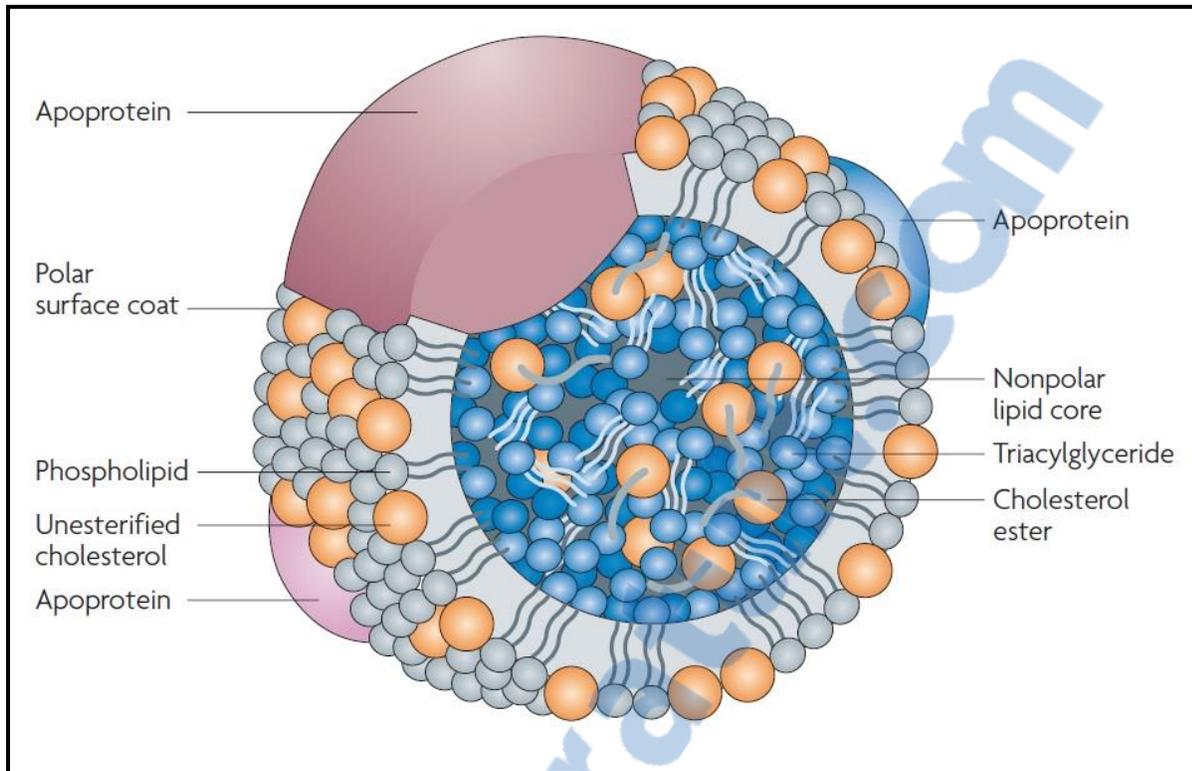
faible espérance de vie, une réduction de la densité minérale osseuse et une calcification ectopique de la VA [231,232]. De plus, les souris déficientes en FGF-23 développent à la fois une calcification vasculaire et une diminution marquée de la densité osseuse [233].

# **Chapitre 2 : Rôle des lipoprotéines dans le développement du RAC**

La première étude qui a vraiment soutenu l'hypothèse que le RAC n'est pas seulement un processus passif, mais bien un processus actif est celle de Catherine Otto et son équipe en 1994. Dans cette étude ils ont observé la présence des lipides et lipoprotéines au niveau des tissus valvulaires explantés de patients avec RAC. En effet, ils ont démontré que les lésions retrouvées dans les feuillets de VA calcifiées sont composées de lipoprotéines, de macrophages, de lymphocytes T, de protéines et de calcium [107]. Ces observations suggèrent que divers processus biologiques sont impliqués dans la progression du RAC, notamment l'oxydation des lipides dans la VA. Par conséquent, l'infiltration lipidique dans les feuillets de la VA puis leur oxydation jouent un rôle majeur dans la promotion de l'inflammation et le développement du RAC.

## **2.1 Généralité sur les lipoprotéines**

Les lipides sont des molécules insolubles dans le plasma sanguin. Leur transport entre les différents tissus tel que l'intestin, le foie et les tissus périphériques dans la circulation sanguine doit être pris en charge par les lipoprotéines. Ces dernières sont responsables du transport des lipides (composés hydrophobes) dans le sang [234-237]. En effet, les lipoprotéines sont des particules globulaires de masse moléculaire élevée constituées d'un cœur lipophile contenant des triglycérides (TG) et des esters de cholestérol (EC) et d'une couche de surface polaire soluble dans le sang qui est formée de phospholipides (PL), de cholestérol libre non estérifié (CL) et des apolipoprotéines (Figure 2-1). Les apolipoprotéines servent comme ligands afin de faciliter l'interaction des lipoprotéines avec leurs récepteurs ainsi qu'avec certaines lipases. De plus, elles peuvent établir la fonction et le destin métabolique de la particule lipidique [236-237]. En outre, durant leur transport, les lipoprotéines subissent des modifications complexes qui affectent leur composition, leur structure et leur fonction. Elles seront également captées par des récepteurs pour libérer leur contenu aux cellules cibles.



**Figure 2-1 :** Structure de base d'une lipoprotéine. La lipoprotéine est une structure sphérique composée d'un coeur de cholestérol estérifié et de triglycérides (TG), entouré par une couche de phospholipides et de cholestérol dans laquelle sont encastrées des apolipoprotéines. Tiré de: [236].

### ***2.1.1 Les différentes classes de lipoprotéines***

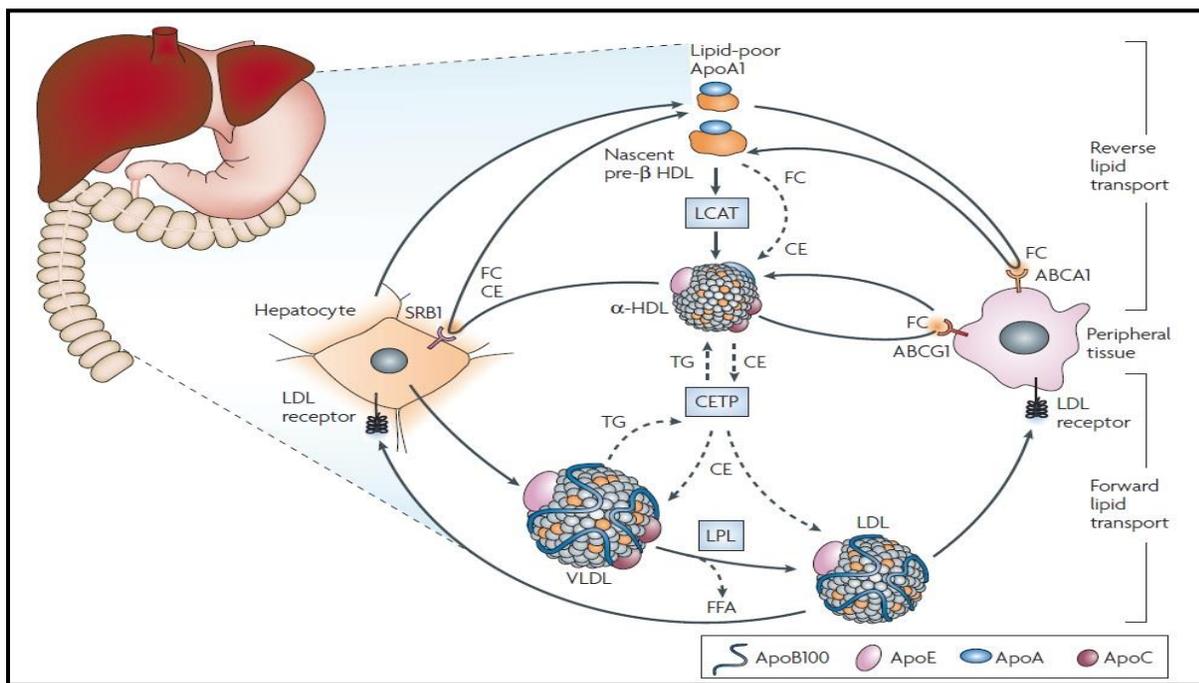
Les lipoprotéines sont catégorisées en cinq grandes classes selon leur taille, leur densité, leur composition en lipides et apolipoprotéines, ainsi que selon leur fonction : les chylomicrons (CM), les lipoprotéines à très faible densité (VLDL), les lipoprotéines à densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines à faible densité (LDL) et les lipoprotéines à densité élevée (HDL) [237]. Chacune de ces classes de lipoprotéine transporte les quatre types de lipides, mais en des proportions différentes. Les principales propriétés physico-chimiques des lipoprotéines sont décrites dans le tableau 2-1.

Classe	Densité (g/mL)	Diamètre (Å)	Mobilité électrophorétique	Principales apo	Principaux lipides
CM	<0.95	800-5000	Origine	A-I, A-II, A-IV, B-48, C-II, C-III, E	TG
Résidu de CM	<1.006	>500	Origine	B-48, E	TG, EC
VLDL	<1.006	300-800	Pré-β	B-100, C-II, C-III, E	TG
IDL	1.006-1.019	250-350	β étendue	B-100, C-II, C-III, E	TG, EC
LDL	1.019-1.063	180-280	β	B-100	EC
HDL2	1.063-1.125	90-120	α	A-I, A-II	EC, PL
HDL3	1.125-1.210	50-90	α	A-I, A-II	PL
Lp[a]	1.055-1.120	180-280	Pré-β	B-100, apo [a]	EC

**Tableau 2-1** : Principales propriétés physico-chimiques des lipoprotéines. CM: Chylomicrons; VLDL: Very-low-density lipoproteins; IDL: Intermediate-density lipoproteins; LDL: Low-density lipoproteins ; HDL: High-density lipoproteins; Lp[a]: Lipoprotein(a); B-100: apolipoprotéine B-100; A-I : apolipoprotéine A-I; TG : triglycérides; CE : esters de cholestérol PL : phospholipides. Adapté de Gotto et al., 2003 et Jean-Charles Hogue, 2008.

D'abord, les CM et les VLDL sont des particules riches en TG alors que les LDL et les HDL le sont en cholestérol. Ainsi, les lipoprotéines peuvent être caractérisées par la ou les apolipoprotéines qui se trouvent à leur surface et qui sont en effet différentes d'une classe à l'autre. En effet, lors d'un apport nutritionnel riche en lipides, des micelles contenant les acides gras et les TG vont dans les cellules épithéliales de l'intestin où sont formés des **chylomicrons (CM)**. Chaque particule de CM contient à leur surface l'apolipoprotéine B48 (ApoB48) nécessaire à leur assemblage et sécrétion [238,239]. Ces grosses lipoprotéines riches en TG vont dans la circulation systémique où elles font l'acquisition de l'apolipoprotéine E (ApoE) et de l'apolipoprotéine C (ApoC). Cette dernière permet la clairance des TG qui sont hydrolysés par une lipase lipoprotéique (LPL), libérant ainsi des acides gras libres dans les tissus. Une fois libérés dans la circulation sanguine, les résidus des CM sont ensuite métabolisés dans de nombreux tissus (foie, adipocytes, muscles squelettiques) [240]. Les résidus des CM sont alors captés par le foie grâce à l'ApoE (Figure 2-2).

Par la suite, des **VLDL** sont produits et sécrétés par le foie et contiennent à leur surface l'apolipoprotéine B100 (ApoB100). Cette dernière est nécessaire à leur assemblage et à leur sécrétion [241]. Ces VLDL participent au transport des lipoprotéines depuis le foie jusqu'aux tissus périphériques. En effet, une fois dans la circulation sanguine, les VLDL acquièrent l'ApoE et l'ApoC. Ensuite, les triglycérides des VLDL sont dégradés en acides gras libres par la LPL et la lipase hépatique (LH) afin de générer une série de plus petites particules enrichies en cholestérol, soient les IDL et les LDL [239, 241-242]. Les IDL constituent des particules de taille et de densité intermédiaires entre les VLDL et les LDL. Elles peuvent être directement captées par le foie ou être converties en LDL par l'action de la LH (Figure 2-2).

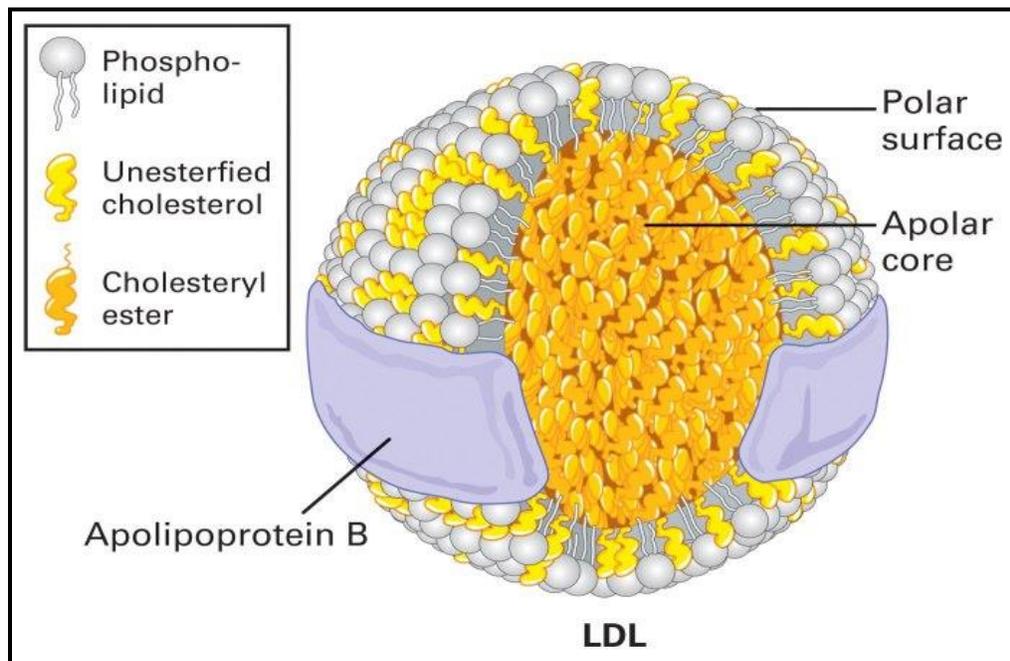


**Figure 2-2:** Métabolisme et transport des triglycérides et des lipoprotéines. ApoA1: apolipoprotein A1; ABCA1: ATP-binding cassette A1; FC: Free cholesterol; HDL: High density lipoproteins; LCAT: Lecithin-cholesterol acyltransferase; PLTP: phospholipid transfer protein; CETP: cholesteryl ester transfer protein; ABCG1: ATP binding cassette transporter G1; SRB1: Scavenger receptor B1; VLDL: Very low density; LPL: Lipoproteins lipoprotein lipase; FFA: free fatty acids; LDLs: low density lipoproteins CE: cholesterol ester; TG: triglyceride. Les lignes pleines représentent les voies des lipoprotéines; les lignes pointillées représentent le transfert des lipides. Adapté de : [236].

## 2.1.2 Les lipoprotéines de basse densité (LDL)

### 2.1.2.1 Structure et fonctions des LDL

Les LDL sont les produits finaux issus des IDL et les petites lipoprotéines riches en cholestérol. Ils représentent la dernière classe de la cascade des lipoprotéines contenant l'apo B-100 [239,241]. Pour chaque molécule d'apo B-100 est associée des lipides de surface (cholestérol non estérifié et phospholipides) et des lipides internes (esters de cholestérol et triglycérides) (figure 2-3).



**Figure 2-3 :** Représentation graphique de la composition d'une particule de LDL.

Source : <https://sbyireview.com/2016/07/26/low-density-lipoproteins-may-affect-cognitive-function/>

Par ailleurs, une grande portion des LDL retourne au foie via le récepteur des LDL (LDLR) grâce à l'ApoB100. Cependant, le rôle principal des LDL est de transporter le cholestérol du foie aux tissus périphériques. Ce processus est essentiel à la formation des membranes cellulaires et/ou les hormones sexuelles [236]. Il a également été démontré que les LDL constituent une classe hétérogène de lipoprotéines qui varient selon leur densité, leur taille et leur composition. Ces paramètres avaient une influence sur le risque de maladies cardio-vasculaires (MCV) [243-246]. Même si toutes les LDL sont athérogènes, les LDL petites et denses seraient plus facilement

internalisées dans l'espace sous-endothélial [247]. Ces lipoprotéines sont, par la suite, retenues par les protéoglycanes et elles subissent une oxydation, ce qui augmente leur risque athérotrombotiques [247]. Enfin, il a été récemment démontré que le score de risque génétique, qui tient en compte plusieurs variant génétique et qui détermine les niveaux des LDLs, est associé au développement du RAC [39].

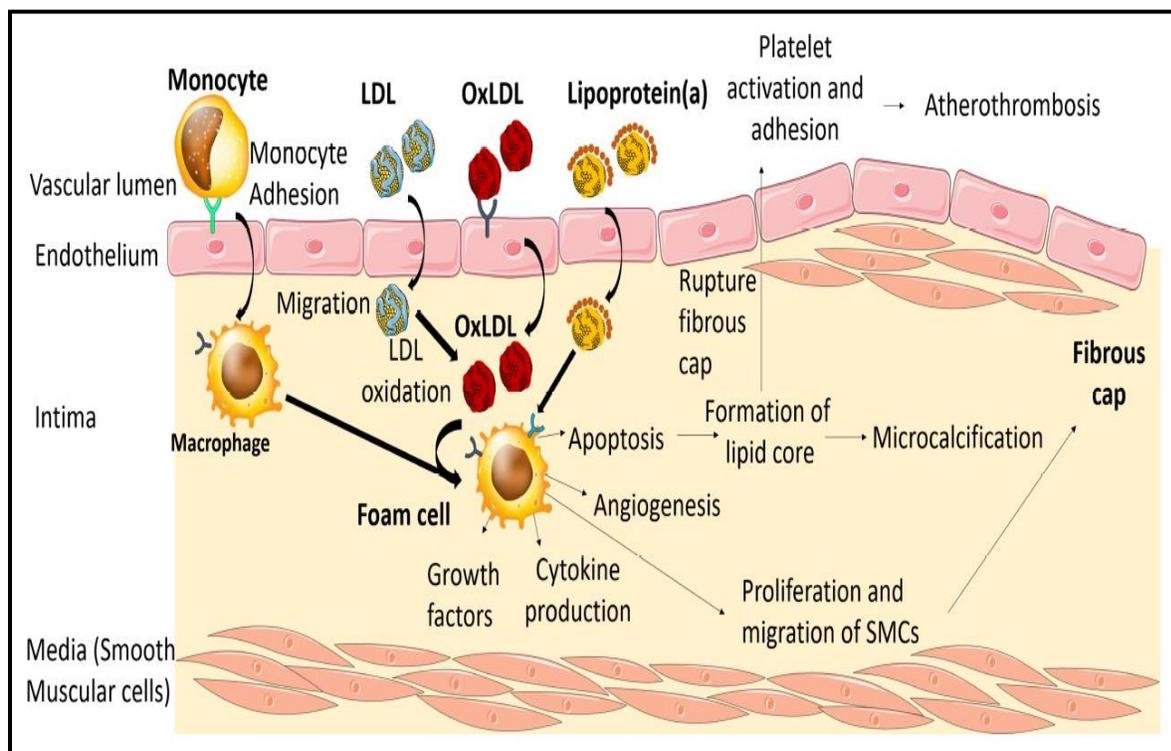
### ***2.1.2.2 Phénotype des LDL petites et denses: rôle dans le RAC***

Dans plusieurs études, le phénotype hautement athérogène des particules de LDL petites et denses a été associé au risque cardiovasculaire [243-246].

En premier lieu, l'étude « Cardiovascular Heart Study » (CHS) a rapporté que le niveau de LDL-cholestérol était un indicateur indépendant de la présence de sclérose ou de sténose valvulaire aortique [34]. Des études rétrospectives ont également démontré que les personnes souffrant du RAC ont des taux de cholestérol et de LDL plus élevés [248, 211]. En revanche, la preuve incontestable que l'infiltration de LDL est un processus actif dans le développement du RAC a été apportée par Otto et ses collaborateurs. Ces constatations ont été confirmées par l'équipe d'O'Brien qui ont révélé la présence de différents types d'apolipoprotéines dans les VA [86]. À l'état normal, apo(a) et ApoB ne sont pas retrouvés dans les valves saines. Cependant, O'Brien et al. ont observé ces apolipoprotéines au niveau extracellulaire dans les lésions de VA calcifiées et plus spécifiquement dans la couche de fibrosa. En outre, d'autres travaux faits sur des VA calcifiées chez des patients ayant subi un RVA ont révélé une colocalisation de LDLs oxydés (Ox-LDLs) et d'ApoB dans le même tissu, confirmant ainsi les trouvailles d'O'Brien et son équipe [87].

En second lieu, de nombreuses études épidémiologiques ont souligné que LDL est un facteur de risque pour le développement du RAC [34]. Par ailleurs, une étude rétrospective chez des patients a examiné le lien entre le bilan lipidique et la progression du RAC. Cette étude a démontré qu'il y a une association entre un niveau élevé de LDL, un faible niveau de HDL et un ratio élevé du Cholestérol/HDL avec une progression plus rapide du RAC [249]. Ainsi, dans le RAC, l'accumulation des Ox-LDLs a un rôle particulièrement important à jouer, notamment dans la promotion de l'inflammation et la minéralisation de la VA. En effet, les Ox-LDLs ont été rapportés pour agir comme un signal de danger qui initiera les mécanismes physiopathologiques du RAC [250] (Figure 2-4). Tout d'abord, il a été démontré que les LDLs subissent facilement une oxydation et se transforment en Ox-LDLs [251]. En outre, des études sur des CIVs isolées ont montré que les Ox-LDLs agissent comme des inducteurs de la minéralisation [252]. Notre groupe

de recherche a démontré que dans des VA calcifiées, les proportions plasmatiques de LDL petite et dense sont associées avec des niveaux élevés en Ox-LDLs [83]. Ainsi, le niveau d'oxydation des LDLs au sein du tissu valvulaire est associé avec l'infiltration des cellules inflammatoires et à une sévérité plus importante du RAC [83]. Mohty et al. ont aussi démontré que la petite taille des LDL est associée à des hauts niveaux d'Ox-LDLs, et est liée à une progression rapide du RAC [83]. De surcroit, le niveau élevé de LDL petite et dense chez les patients atteints du syndrome métabolique (SM) était associé à un taux de progression rapide du RAC dans ce groupe de patients [89,90]. De façon intéressante, l'analyse de valves explantées lors d'un RVA a montré que les VA calcifiées sont infiltrées par une quantité très élevés de LDL oxydés [84]. De même, le niveau d'Ox-LDL sanguin a également été associé de façon positive à l'inflammation et à un degré de remodelage fibrocalcique sévère de la VA. Ceci suggère que l'accumulation des Ox-LDLs est associée au processus inflammatoire, à l'activité ostéoblastique, à la minéralisation et à la fibrose du tissu valvulaire [84,86,150,253]. En 2001, Pohle et al. ont également montré que les patients souffrant d'hypercholestérolémie (LDL > 130 mg/dL) avaient une progression plus rapide de score calcique de la VA. En effet, ils ont pu montrer que le taux de LDL influence le degré de la progression de la maladie valvulaire indépendamment des facteurs de risques traditionnels [254]. En dernier lieu, il a été bien démontré qu'une fois incorporés dans les tissus, les LDLs peuvent subir une oxydation [255]. Cette oxydation des lipides induit l'expression des molécules d'adhésion telles que VCAM-1, ICAM-1 et MCP-1[256,257]. Ce processus favorise, à son tour, le recrutement de monocytes dans les valves et leur activation en macrophages [256,257] (Figure 2-4). À leur tour, les macrophages activés par les Ox-LDLs, sécrètent plusieurs cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  et RANKL. Ces dernières induisent la différenciation ostéoblastique des CIVs et favorisent ainsi la minéralisation de la VA [130]. En effet, en accumulant des Ox-LDLs (par endocytose), les macrophages peuvent se transformer en cellules spumeuses qui amplifient aussi les processus pro-inflammatoires dans la VA [119] (Figure 2-4). Le stade oxydé des LDLs est donc un facteur important qui joue un rôle crucial dans le recrutement des cellules inflammatoires, et dans l'activation des macrophages en cellules spumeuses.



**Figure 2-4 :** Schémas représentant les mécanismes pathobiologiques par lesquelles les LDL oxydées favorisent la progression du RAC. Tiré de Benoit J. Arsenault et al. 2017.

Source : DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2017.09.016>.

## 2.1.3 Les lipoprotéines de haute densité (HDL)

### 2.1.3.1 Structure et fonctions des HDL

Les HDLs sont les particules les plus petites et les plus denses parmi les autres lipoprotéines. Elles sont responsables du transport rétrograde du cholestérol [258]. C'est une voie métabolique par laquelle les HDLs, contenant l'apolipoprotéine A1 (ApoA1), acquièrent du cholestérol provenant des tissus périphériques et le transporte ensuite vers le foie afin qu'il soit éliminé sous forme de bile [259]. Comme les LDLs, il existe une certaine hétérogénéité à l'intérieur de la classe des HDLs [259,260]. Les particules de HDL peuvent être séparées en trois classes selon leur densité : les HDL naissantes, les HDL2 et les HDL3. Les HDL naissantes en forme de disque sont synthétisées dans le foie. Ils sont constitués en majeure partie de phospholipides, d'Apo A1 et du cholestérol libre provenant des résidus de chylomicrons et de VLDL [237, 261-261]. Une fois dans la circulation, les HDL naissantes acquièrent d'autres apolipoprotéines

(ApoA2-4 et ApoE) et deviennent plus sphériques [239, 261-262]. En effet, l'ApoA1 du HDL peut interagir avec le transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette 1 sub-family A member 1) et le transporteur ABCG1 (ATP-binding cassette sub-family G member 1) directement dans les tissus. Grâce à ce rôle d'ApoA1, ces HDLs sphériques pourront accumuler le cholestérol présent dans les tissus périphériques qui a été estérifié par l'enzyme LCAT (Léthicin-Cholesterol Acyltransferase) [261]. Donc, l'apoA1 est l'élément central des particules de HDL et joue un rôle primordial dans le transport inverse du cholestérol via les transporteurs ABCG1 et ABCA1. De surcroît, l'interaction des HDLs avec ABCA1 permet de retirer le cholestérol déjà accumulé dans les macrophages et d'autres cellules [263]. Cependant, d'autres mécanismes expliquent l'effet anti-athérogène des HDLs. D'une part, les HDLs portent à leur surface des molécules antioxydante telles que la PON1 (paraoxonase 1). Cette dernière diminue l'oxydation des lipides et réduit par conséquent l'accumulation des Ox-LDLs et leurs effets inflammatoires dans les tissus [264,265]. En second lieu, des évidences indiquent que les niveaux de HDL sont inversement corrélés aux risques d'évènements cardiovasculaires. En effet, ces lipoprotéines possèdent des effets pléiotropes et leur rôle anti-athérogénique est dû à leurs effets anti-inflammatoires et antioxydants [265-267]. À cet égard, plusieurs études ont démontré l'effet bénéfique des HDL sur l'athérosclérose et les autres MCV [265-267]. D'une part, les HDLs peuvent entraîner la réduction de certaines cytokines inflammatoires produites par les macrophages tels que le TNF- $\alpha$  et IL1- $\beta$  [267, 268]. D'autre part, il a été suggéré que les HDL peuvent exercer une action anti-inflammatoire en diminuant l'expression des molécules d'adhésion cellulaire telles que ICAM-1 ou VCAM-1 [269].

### ***2.1.3.2 Rôle des HDLs dans le RAC***

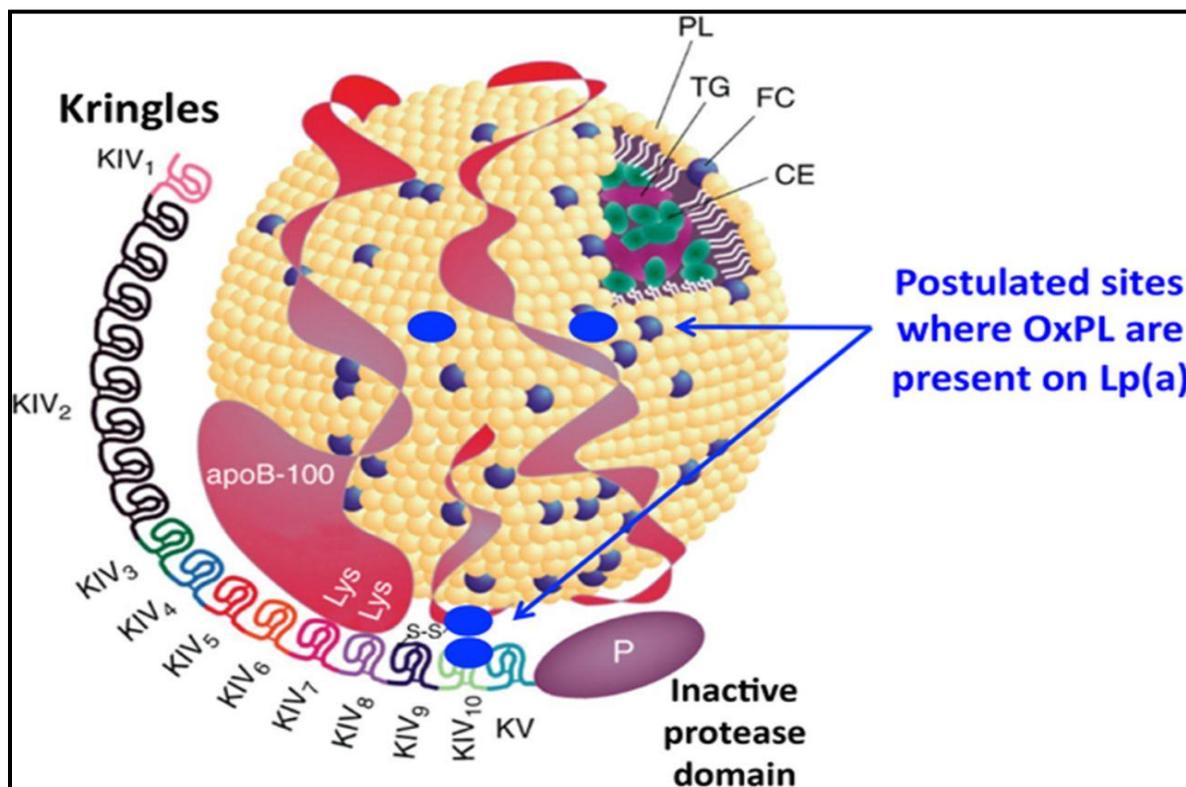
En ce qui concerne le processus du RAC, il a été démontré que les HDL agissent comme des réducteurs de la minéralisation chez les cellules musculaires vasculaires lisses (CMLV) [270]. En outre, quelques études ont démontré que les taux plasmatiques de HDL sont inversement associés à la progression du RAC [249]. De même, la quantité de HDL valvulaire était réduite dans le RAC [271]. En effet, cette étude a révélé que le HDL induit à la fois la sécrétion d'OPG, un antagoniste de la calcification valvulaire, et réduit l'expression de TNF- $\alpha$  *in vitro* [271]. Par ailleurs, la perfusion d'un peptide mimétique de l'apoA1 entraîne la régression du RAC chez le modèle de lapin hypercholestérolémique [271,273,274]. Cependant, il a également été démontré que l'apoA1 peut contribuer à la formation de protéines amyloïdes. Ces substances favorisent la minéralisation des CIVs isolées, et elles ont été retrouvées en grandes quantités dans les VA

humaines calcifiées [272]. Ces données indiquent que le ciblage des HDLs est un intérêt thérapeutique potentiel. Toutefois, la fonction des HDLs dans le contexte de minéralisation de la VA reste controversée. D'autres travaux sont donc nécessaires pour comprendre le rôle des HDLs dans la physiopathologie du RAC. En 2014, Arsenault et al. ont évalué la fonctionnalité des HDLs chez les patients atteints du RAC. Les résultats de cette étude épidémiologie suggèrent que les variants génétiques associés avec les niveaux sériques d'HDL et des fonctionnalités de l'HDL, tels que les capacités d'efflux de cholestérol, ne semblent pas influencer la susceptibilité du RAC [120]. L'étude conclut que les HDLs ne sont pas liées avec la calcification de la VA de façon causale.

## ***2.1.4 Lipoprotéine(a) [Lp(a)]***

### ***2.1.4.1 Structure, fonction et hétérogénéité génétique***

La Lp(a) est une lipoprotéine riche en cholestérol qui présente une structure similaire à la particule LDL [275, 276]. Il s'agit d'une particule LDL contenant une glycoprotéine appelée apolipoprotéine (a) [apo(a)]. Cette dernière forme une liaison covalente avec l'ApoB-100 de LDL grâce à un pont disulfure [277, 278] (Figure 2-5). L'apo(a) présente une forte homologie avec le plasminogène, mais elle est dépourvue d'activité fibrinolytique (ou protéolytique) [279]. En effet, l'apo(a) présente de nombreuses séquences homologues au plasminogène connus comme des multiples domaines répétés nommés « kringles (K) ». Ces motifs contribuent à la forte hydrophilicité de Lp(a) [276] (Figure 2-5). Bien que les trois premières sous-unités protéiques (KI, KII et KIII) du plasminogène ont été perdues, l'apo(a) contient les kringles de types 4 et 5 (KIV et KV) et un domaine protéase inactivée (inactive protease-like domain) [279, 280]. Parmi les 10 différents sous-types de séquences KIV chez l'apo(a), 9 types sont présents en une seule copie dans toutes les isoformes. Néanmoins, un d'entre eux, le sous-type 2 (ou KIV-2), se répète en nombre extrêmement variable selon les individus (entre 2 et 40) [281-283]. Cette variation du nombre de copies dites CNV (copy number variation) est codée au niveau des allèles du gène *LPA* (le gène codant apo[a]) et explique l'hétérogénéité de la taille de l'isoforme apo(a) observée dans la population humaine (taille varie entre 200 et 800 kDa) [109, 284].



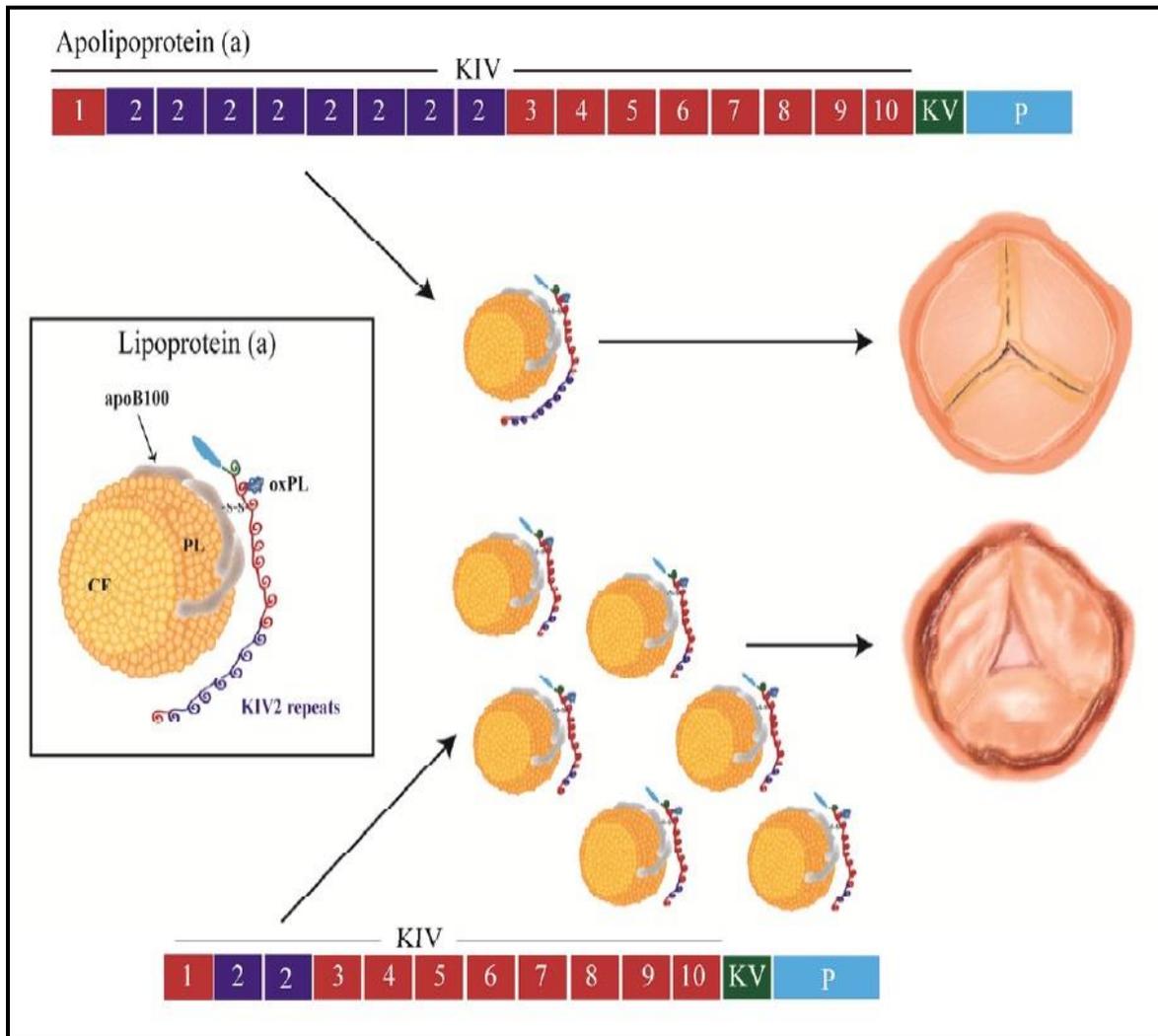
**Figure 2-5:** Représentation schématique de la lipoprotéine(a) [Lp(a)] avec ses composants protéiques (ApoB : apolipoprotéine B et apo(a) : apolipoprotéine(a)) et lipidiques (PL : phospholipides ; CE : esters de cholestérol ; FC : cholestérol libre ; TG : triglycérides). Adapté de : [276].

#### 2.1.4.2 Déterminants génétiques

Tout d'abord, il est important de noter que le CNV a un impact important sur le niveau de Lp(a). En effet, les concentrations plasmatiques de Lp(a) sont relativement stables au sein d'un individu [109, 285]. Cependant, son taux plasmatique varie de façon remarquable entre les individus: entre 0,1 mg/dL et plus de 200 mg/dL (soit un rapport de plus de 1000 fois) avec une distribution très asymétrique puisque la majorité des gens ont des taux inférieurs à 10 mg/L [286, 287]. Particulièrement, les concentrations de Lp(a) sont déterminées génétiquement par le polymorphisme du gène *LPA* [109, 286]. En effet, les niveaux plasmatiques de Lp(a) sont inversement corrélés à la taille de l'allèle apo(a) [288] (Figure 2-6). Bien que le polymorphisme du gène *LPA* reste le facteur principal impliqué dans la variation des concentrations plasmatiques de Lp(a), les individus ayant le même nombre de copies KIV2 peuvent avoir des niveaux de Lp(a) très différents [109]. Cela suggère que cette variation n'est pas entièrement expliquée par le CNV

de KIV<sub>2</sub>. Ainsi, il convient de souligner que, comparativement aux autres classes de lipoprotéines, les concentrations de Lp(a) sont relativement résistantes aux changements dues à l'âge, le sexe, l'alimentation et l'exercice [276].

En second lieu, il est intéressant de noter que la plupart des découvertes récentes sur Lp(a) ont été révélées à partir des études génétiques. En effet, dans l'année 2009, deux études remarquables ont montré que le taux élevé de Lp(a) est déterminé génétiquement [109, 289]. Ces études ont également révélé un lien de causalité entre le taux élevé de Lp(a) et le développement de la maladie coronarienne [290]. En outre, la concentration plasmatique de Lp(a) dépend soit de la structure (taille) de l'isoforme de l'apo(a), soit de la présence des variants génétiques (CNV) [290, 291]. Ainsi, les sujets héritant d'isoformes d'apo(a) de petite taille ont une sécrétion plus importante d'apo(a) que les sujets ayant des isoformes de grande taille [292]. Il existe donc une corrélation inverse entre le taux de Lp(a) et le nombre de domaines kringle-IV-2 présent sur le gène LPA [276] (Figure 2-6). À cet égard, le polymorphisme de taille ainsi que d'autres variations de séquences du *LPA* expliquent 70 à 90% de la variabilité des concentrations de Lp(a) dans la population. On peut également ajouter qu'il existe des variations interethniques dans les niveaux de Lp(a). En effet, les sujets noirs ont en moyenne un taux 100% supérieur en comparaison des sujets caucasiens. Ainsi, les sujets africains ont des concentrations plus élevées de Lp(a) comparés aux sujets européens et asiatiques [294, 295]. De façon intéressante, des études récentes de randomisation mendélienne ont aussi révélé un lien causal entre la Lp(a) avec le RAC [109]. D'abord, dans une étude d'association pangénomique GWAS (genome-wide association study), Thanassoulis et al. ont démontré qu'une variante génétique, rs10455872 situé dans le locus du gène LPA codant pour la Lp(a), est associé de manière causale avec le RAC [35]. Par la suite, cette étude a été répliquée par deux autres études de randomisations mendéliennes qui ont également mis en évidence un lien causal entre le variant rs10455872 et les niveaux de Lp(a) [36, 37]. De plus, Capoulade et al. ont récemment montré que les niveaux circulants de Lp(a) étaient significativement associés à la progression du RAC [38].



**Figure 2-6:** Polymorphisme de l'apolipoprotéine (a) et relation entre le nombre de Kringles IV-2 et le taux de circulants de Lp(a) : association avec le RAC. Tiré de [109].

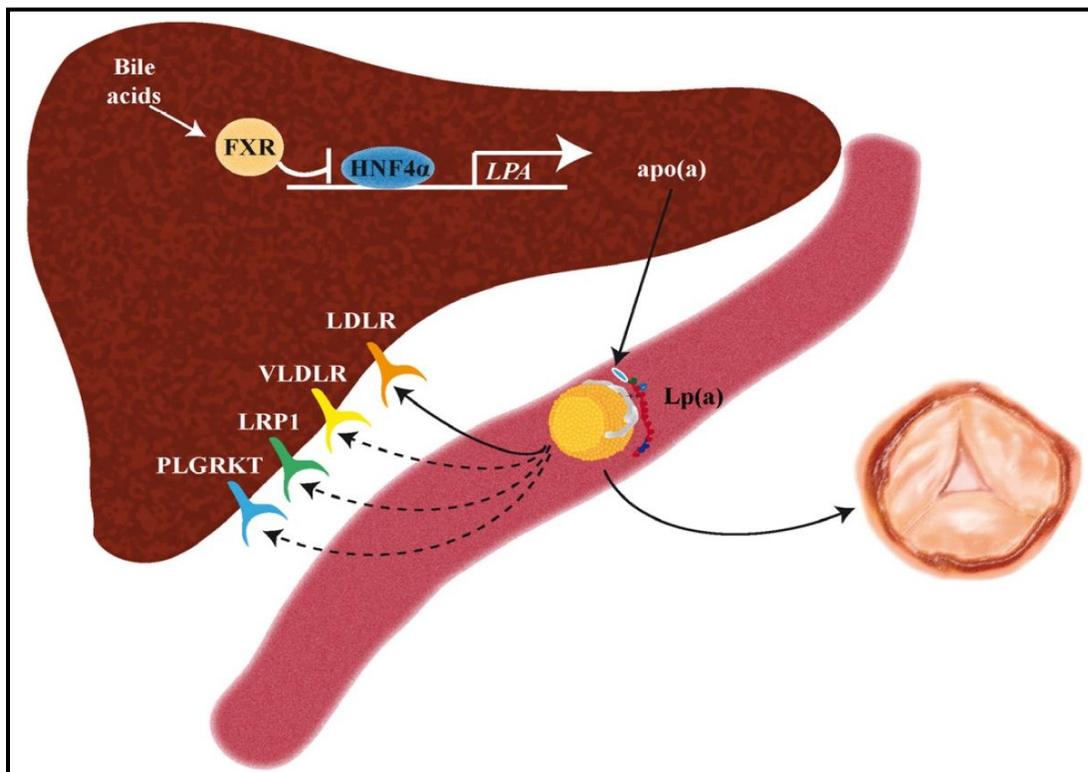
### 2.1.4.3 Production, métabolisme et catabolisme de Lp(a)

L'apo(a) est synthétisée dans le foie. Des études *in vivo* suggèrent que la variation dans le taux du Lp(a) chez les individus ayant différentes isoformes est due principalement à la variabilité de sa synthèse plutôt que son catabolisme [292, 296] ; cela pourrait être lié à une faible sécrétion des longues isoformes d'apo(a) [276].

D'intérêt, le promoteur du gène apo(a) contient des sites de liaison pour le récepteur FXR (Farnesoid X Receptor) qui agit comme régulateur négatif de l'expression du gène *LPA* [109, 297] (Figure 2-7). Le récepteur FXR est en compétition avec le facteur nucléaire HNF4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ), un régulateur positif de l'expression du gène *LPA*. Étant donné que les acides

biliaires sont des ligands naturels pour le récepteur FXR, cela pourrait expliquer que les patients atteints de choléstase ont des niveaux inférieurs de Lp(a) dans la circulation [109, 297]. Malgré le nombre d'études examinant la cinétique de Lp(a), le mode de synthèse exact et le site du catabolisme Lp(a) ne sont pas très bien compris. Ainsi, bien que le foie soit l'organe principal responsable du catabolisme de Lp(a) [298], l'identité du récepteur ou des récepteurs qui lient et internalisent la Lp(a) reste à définir. Effet, des études *in vitro* suggèrent que le catabolisme du Lp(a) repose, au moins en partie, sur le récepteur LDLR (low density lipoprotein receptor), alors que l'implication du récepteur VLDLR (LRP1) et le récepteur de plasminogène (PLGRKT) reste à élucider [109, 299]. Récemment, deux études ont rapporté que la Lp(a) est internalisée dans les cellules hépatiques via LDLR, et que cette internalisation est régulée par la protéine PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), un facteur qui diminue le nombre des LDLR à la surface des hépatocytes [109]. De plus, l'internalisation de Lp(a) par le LDLR dépend de l'association de l'apo(a) à l'apo B [300]. Par ailleurs, il a été démontré que des anticorps monoclonaux humains dirigés contre la protéine PCSK9 ont réduit le taux de Lp(a) de façon significative (jusqu'au 32%) [276, 301]. À ce jour, l'impact des statines sur les concentrations de Lp(a) reste controversé, ce qui suggère encore une fois les LDLRs ne sont pas les seuls candidats impliqués dans la clairance de Lp(a) [109]. En effet, la Lp(a) peut se lier à d'autres récepteurs analogues à la famille LDLR, soit le VLDLR (very low density lipoprotein receptor), LRP1 (lipoprotein receptor-related protein1) et LRP2 (ou megalin) [109, 302]. La Lp(a) pourrait être internalisée et dégradée par des fibroblastes embryonnaires de souris qui exprime VLDLR. En effet, chez la souris déficiente en VLDLR, la clairance de Lp(a) est retardée [296]. En outre, Lp(a) peut se lier au récepteur LRP2 (ou megalin), un membre de la famille des LDLR très exprimé dans les reins [303]. De ce fait, l'élévation du taux de Lp(a) chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique serait reliée à LRP2 [304]. L'insuffisance rénale accroît le taux de Lp(a) et l'insuffisance hépatique le décroît [325].

Récemment, le récepteur « scavenger » SR-B1 (scavenger receptor-B1), connu comme étant un récepteur des HDL, a été identifié comme un récepteur impliqué dans le catabolisme de Lp(a) [276, 305]. En effet, des études *in vitro* ont démontré que SR-B1 favorise l'absorption des composants lipidiques et protéiques de Lp(a) [305]. Le rôle du SR-B1 dans le catabolisme Lp(a) a également été confirmé chez des souris transgéniques. En effet, la déficience ou la surexpression de SR-B1 chez la souris affecte clairement le catabolisme de Lp(a), suggérant le rôle majeur de ce récepteur dans la clairance de Lp(a)[305].



**Figure 2-7 :** Métabolisme de Lp(a). Dans le foie, le récepteur farnésioïde X (FXR) est un régulateur négatif, tandis que le facteur nucléaire hépatocytaire 4α (HNF4α) favorise l'expression de l'apolipoprotéine(a) [apo(a)]. Le catabolisme de Lp(a) est assez controversé, mais des études ont montré qu'il repose, au moins en partie, sur le récepteur de LDL (LDLR), alors que l'implication du récepteur de VLDLR et le récepteur du plasminogène (PLGRKT) reste à élucider. Tiré de [109].

## ***2.1.5 Lp(a) et les phospholipides oxydés : implication dans le RAC***

### ***2.1.5.1 Les phospholipides oxydés (OxPLs)***

Les OxPLs qui sont liés de manière covalente à la protéine apo(a) jouent un rôle clé dans la fonctionnalité des Lp(a) [306, 307]. En effet, plusieurs évidences démontrent que la propriété proinflammatoire du Lp(a) est due à son contenu en OxPLs [307-309].

Tout d'abord, les phospholipides (PLs) qui sont les composants majeurs des membranes cellulaires jouent un rôle crucial dans la biochimie de toutes les cellules vivantes. Ils agissent également comme des substrats essentiels pour la synthèse de médiateurs de signalisation cellulaire [309]. Les PLs sont formés d'un squelette de glycérol lié à deux acides gras (non polaires en position sn1 et sn2) et à un groupement phosphate (une tête polaire à la position sn3) estérifié par un groupement polaire (alcool) qui diffère selon la classe des lipides. Les OxPLs sont générés lors de l'oxydation des acides gras polyinsaturés, qui sont habituellement estérifiés en position sn-2 de glycérol [306, 310-311]. En premier lieu, l'oxydation de ces PLs peut être initiée soit par des mécanismes enzymatiques ou non enzymatiques, et peut former diverses structures [309-311]. La voie enzymatique s'effectue par des protéines conservées parmi toutes les espèces de mammifères, telles que lipoxygénases (LOX) et cyclooxygénases (COX) [309-311]. Cette voie implique aussi des récepteurs et des voies de signalisation intracellulaire. Par ailleurs, la production des OxPLs par la voie non enzymatique est entraînée par les espèces oxygénées réactives (ROS). L'oxydation des PLs se propage par la suite via le mécanisme classique de la peroxydation lipidique (réaction en chaîne). Ces données suggèrent que la production d'OxPLs ne peut pas être contrôlée en ajustant la quantité ou l'activité des enzymes. Par conséquent, dans le cas de certaines maladies tels que les lésions athérosclérotiques humaines, le stress oxydatif entraîne une synthèse accrue d'OxPLs [306, 309-311].

En second lieu, les OxPLs peuvent se former sur les membranes cellulaires sous des conditions de stress oxydatif, au cours de l'apoptose ou durant les modifications oxydatives des LDL (OxLDLs). Les principaux lipides bioactifs des OxLDL sont issus de l'oxydation des PLs en position sn-2 [306, 310]. En effet, trois OxPLs bioactifs provenant de l'oxydation de 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine ont été identifiés :

(1) **POVPC** (1-palmitoyl-2-oxovaleroyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine) ; (2) **PGPC** (1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine) et (3) **PEIPC** (1-palmitoyl-2-(5,6-epoxyisoprostane E2)-sn-glycero-3-phosphorylcholine) [312]. Les deux OxPLs, POVPC et PGPC,

sont généralement présents dans la fraction d'OxLDLs et peuvent induire plusieurs réponses cellulaires. D'intérêt, ces dérivés lipidiques ont été détectés dans des lésions athérosclérotiques [312]. Tsimikas et al. ont testé un anticorps monoclonal IgM naturel, nommé E06, qui se lie spécifiquement aux têtes de PC des OxPLs (PC-OxPLs) [306, 313]. L'anticorps E06 a permis de détecter le contenu de PC-OxPLs par particule d'apoB-100 (OxPLs/ApoB) dans le plasma et dans les sous-espèces de lipoprotéines [313,314]. Ainsi, ils ont développé puis validé cliniquement une technique ELISA qui reconnaît les OxPLs au niveau des apoB plasmatiques [313]. Cette technique permet de détecter spécifiquement les OxPL liées au Lp(a) ayant des propriétés inflammatoires et athérogènes. Bien que la plupart des OxPLs/ApoB en circulation sont liés à Lp(a), seulement des quantités faibles sont associées sur les LDLs [307]. En effet, des expériences *in vitro* ont démontré que l'OxPL, le plus polaire, pourrait être transféré d'un OxLDL donneur à une particule Lp(a) de manière indépendante des protéines de transfert de lipides [307]. Sur ce point, il a été démontré que suite à une rupture de la plaque athérosclérotique en raison d'une intervention coronarienne percutanée (ICP) la concentration plasmatique de Lp(a) et OxPLs/apoB a augmenté de 65 % et 35 %, respectivement [314].

### ***2.1.5.2 Relation entre les OxPLs et Lp(a)***

Dans un premier temps, une grande proportion d'OxPLs associée au Lp(a) est liée de manière covalente à la protéine apo(a) de Lp(a), plus spécifiquement à son domaine KIV-10. En effet, des évidences indiquent que la liaison d'OxPL à l'apo(a) dépend d'un site de liaison lysine présente dans KIV10 [307,315] (Figure 2-6). À cet égard, il a été démontré que la suppression de ce site KIV10 par l'injection d'adonavirus recombinants chez la souris empêchait l'accumulation d'apo(a) [316]. Aussi, il a été démontré que l'apo(a) peut interagir avec la  $\beta$ 2 glycoprotéine I ( $\beta$ 2GPI), dans le plasma humain ainsi que les surnageants de culture cellulaire, via le site KIV10 [317]. Ces résultats indiquent les nouveaux rôles potentiels de la Lp(a) dans la fibrinolyse et l'auto-immunité.

En second lieu, les OxPLs ne sont pas liés seulement à apo(a), mais sont également présent dans la phase lipidique de la particule Lp(a) [307,315]. Dans le plasma humain, 85 % des OxPLs reliés aux lipoprotéines sont associés à la particule Lp(a), tandis que le reste est principalement lié aux lipoprotéines apoB [307, 313]. Dans la population générale, les niveaux plasmatiques d'OxPL-apoB sont en corrélation avec les concentrations élevées de Lp(a) [313, 319]. Étant donné que la

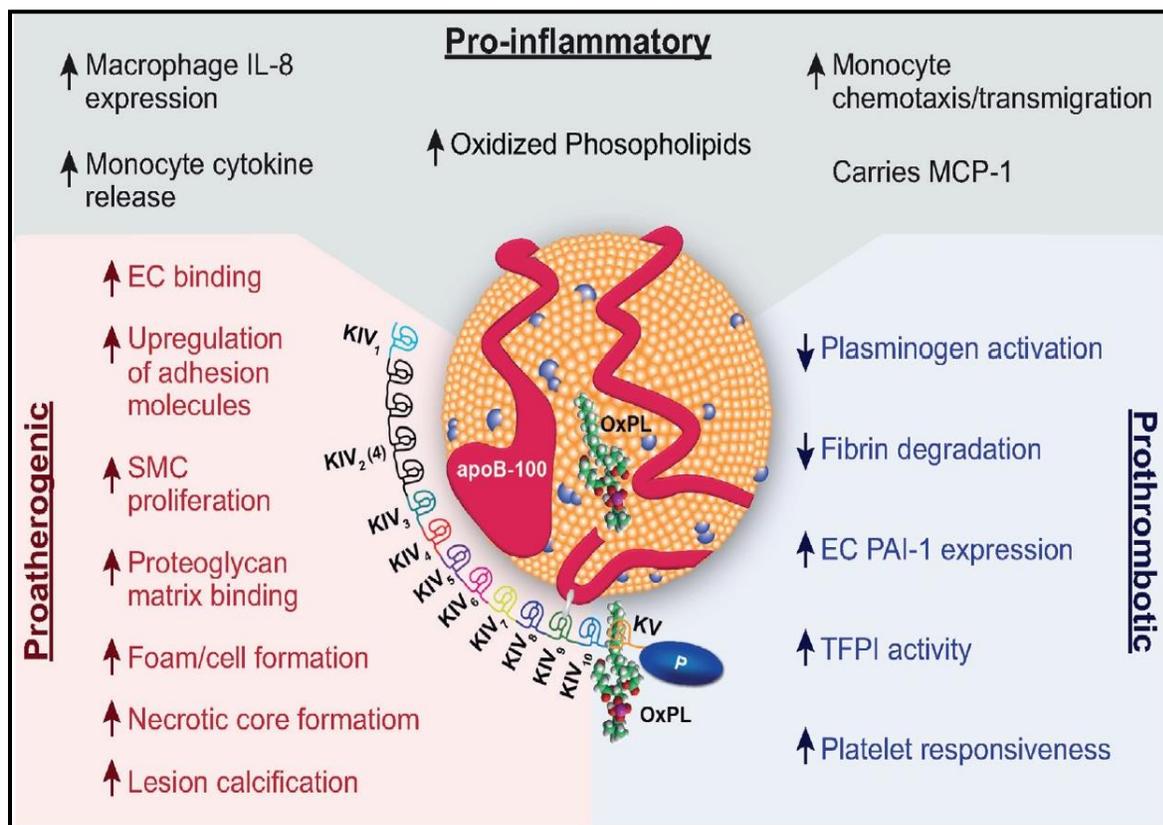
génétique est associée aux niveaux plasmatiques de Lp (a), la corrélation entre OxPL-apoB et Lp(a) dépend de la taille des isoformes de l'apo (a) (selon le nombre de répétitions Kringle) [319].

### ***2.1.5.3 Rôle pathologique d'OxPLs et Lp(a) : deux facteurs de risque de maladies cardiovasculaires (MCV)***

Compte tenu des études cliniques ci-dessus et des études plus récentes chez la souris transgénique pour l'apo (a), il a été suggéré que l'unique rôle physiologique du Lp(a) consiste à lier les OxPLs pro-inflammatoires. Cela peut aussi expliquer, en partie, son rôle physiopathologique comme un facteur de risque de MCV [323] (Figure 2-8).

Tout d'abord, lorsqu'elle est présente à des concentrations plasmatiques élevées, la Lp(a) devient plus athérogène que les LDLs natives. En effet, la Lp(a) peut se lier aux protéoglycanes intimaux artériels avec une forte affinité, entraînant ainsi une augmentation de la concentration intimaux en OxPLs pro-inflammatoires [324]. Sur ce fait, lorsqu'elle atteint des niveaux plasmatiques élevés, la Lp(a) favorise l'athérosclérose (Figure 2-8). Par conséquent, un taux élevé de Lp(a) est corrélé avec un risque élevé de MCV [325]. Dans certaines études, la Lp(a) pourrait également être associée à une activité antifibrinolytique et prothrombotique. De plus, des études soutiennent l'hypothèse que les effets pro-athérogènes de la particule Lp(a) sont dus essentiellement à son contenu en OxPLs [308, 326]. De façon intéressante, les OxPLs sont présents particulièrement sur les petites isoformes d'apo (a). Donc, la forte association des OxPLs avec les petites isoformes de Lp(a) peut expliquer au moins leur athérogénicité accrue ainsi que leur association à un risque élevé de MCV [306,308]. D'intérêt, les études épidémiologiques ont montré une forte corrélation surtout entre OxPL-apoB et entre OxPL-apo(a) [306, 308]. De surcroît, les études précédentes ont démontré que les niveaux augmentés d'OxPLs sont associés à la maladie coronarienne (MC) [313]. Sur ce point, plusieurs travaux cliniques ont montré que les niveaux plasmatiques élevés d'OxPL-apoB prédisent de façon indépendante la survenue d'évènements cardiovasculaires tels que l'infarctus du myocarde (MI) et l'accident vasculaire cérébral ischémique (AVC) [306,308, 327]. De plus, des études *in vivo* et *in vitro* ont révélé des niveaux élevés d'OxPLs dans des lésions athérosclérotiques avancées [306, 308, 328]. En outre, l'augmentation d'OxPL-apoB a été corrélée avec le dysfonctionnement endothélial et la progression de la calcification coronarienne [329]. Également, les niveaux d'OxPL-apoB sont élevés chez les patients avec un syndrome coronarien aigu [330] et chez des patients ayant subi une intervention coronarienne percutanée [314]. Par ailleurs, de nombreuses études *in vitro* ont démontré que les OxPLs peuvent agir comme des

ligands pour les récepteurs de transduction de signal présent sur les surfaces cellulaires. Ces récepteurs tels que CD36, TLR2, et SRB1 peuvent activer différentes cascades de signalisation intracellulaire [331-333]. Aussi, les OxPLs sont impliqués dans la modulation de l'expression de plusieurs gènes liés à l'athérosclérose, l'angiogenèse, l'inflammation et la cicatrisation dans divers types cellulaires [334] (Figure 2-8). Enfin, dans le plasma, il a été rapporté que les OxLDLs et Lp(a) se lie à la molécule pro-athérosclérotique MCP-1 (monocyte chimoattractant protein 1). Cette dernière joue un rôle important dans le recrutement et la migration des monocytes à travers l'endothélium vasculaire [335]. Pris ensemble, les évidences ci-dessus suggèrent que la Lp(a) et son contenu en OxPLs pourraient avoir un impact important sur le développement des maladies cardiovasculaires.



**Figure 2-8 :** Schéma représentant le mécanisme pathogénique de Lp(a). L'athérogénicité de Lp(a) peut être classée principalement en 3 catégories : pro-athérogène, pro-inflammatoire et potentiellement antifibrinolytique. EC : endothelial cell (cellule endothéliale) ; IL-8 : interleukin-8 (interleukine 8) ; MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1; PAI: plasminogen activator inhibitor (l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1); SMC: smooth muscle cell (cellules musculaires lisses) ; TFPI: tissue factor pathway inhibitor (inhibiteur de la voie du facteur tissulaire). Tiré de : [542].

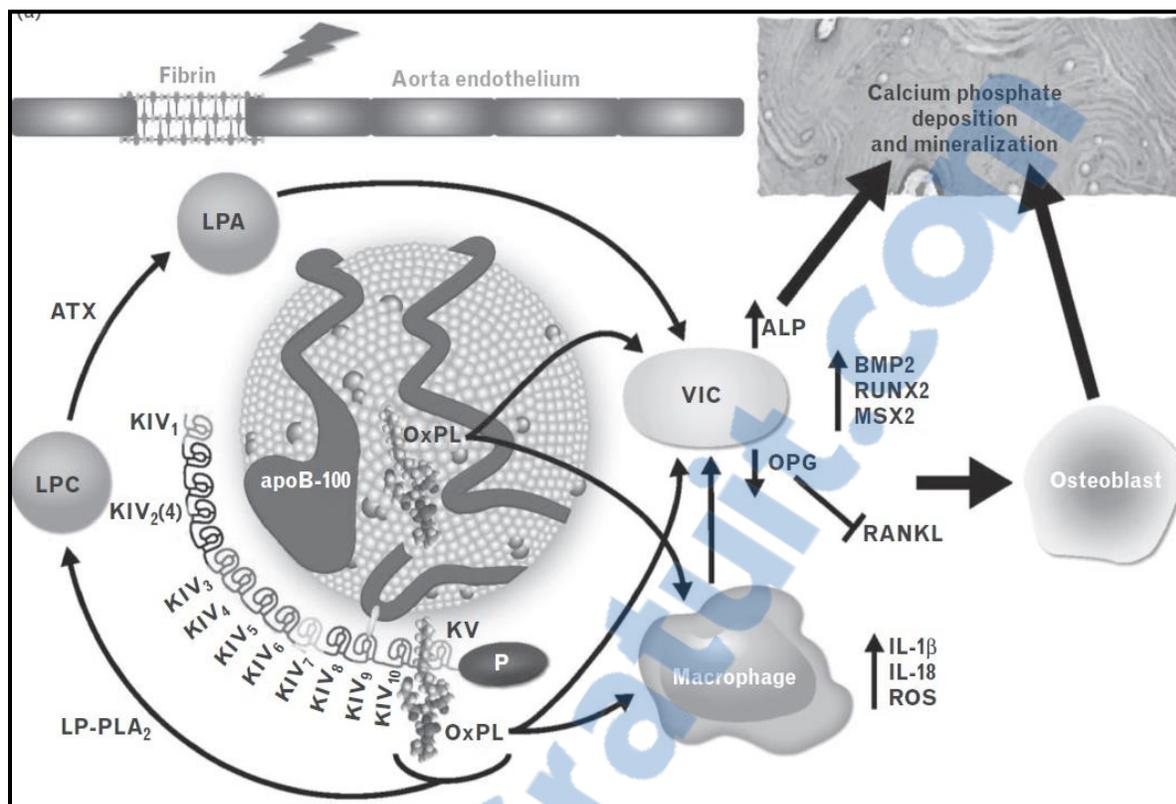
#### 2.1.5.4 Rôle de Lp(a) et OxPLs dans la progression du RAC

Plusieurs études ont démontré que les lipoprotéines oxydées (OxLDLs), fortement enrichies en OxPLs, sont impliquées dans l'inflammation, la calcification ectopique de la VA et la formation osseuse [109, 313, 336].

D'une part, des études histologiques sur des valves calcifiées explantées lors d'un remplacement valvulaire ont révélé la présence d'apoB, apo(a) et apoE à proximité des nodules minéralisés de la VA [86,109]. Aussi, les niveaux des OxLDLs sont associés à la densité des cellules inflammatoires et à l'expression des cytokines [83]. En outre, des travaux *in vitro* effectués sur des CE et CMLs ont montré que les OxLDLs augmentent l'expression de la protéine morphogénique BMP2 [337]

ainsi que les facteurs de transcription ostéoblastique, RUNX2 [338] et MSX2 [339]. Aussi, l'expression de l'ostéoprotégérine, un inhibiteur de la calcification vasculaire via la voie RANK-L a été fortement réduite sous l'effet des OxLDLs [340, 341]. Ainsi, la phosphatase alcaline (ALP), un enzyme impliqué dans la transition ostéoblastique, a été fortement induite par les Ox-LDLs [339, 342]. D'autres études *in vitro* ont également démontré que les Ox-PLs favorisent la minéralisation des CIVs via l'activation des récepteurs TLR-2 et -4 [95,343]. Dans l'ensemble, ces études fournissent encore des preuves solides que les effets pro-athérogènes et proinflammatoires de Lp(a) sont entraînés par son contenu en OxPLs. Par conséquent, les lipoprotéines oxydées jouent un rôle majeur dans la réponse ostéogénique et la minéralisation de la VA.

D'autre part, des études prospectives ont suggéré que les niveaux élevés de Lp(a) et d'OxPLs sont associés avec une progression plus rapide du RAC. Récemment, Thanassoulis et collègues ont identifié un SNP dans le locus du gène LPA (rs10455872) associé à la calcification de la VA [35]. Ainsi, par une approche de randomisation Mendélienne, le même groupe de recherche a démontré un lien causal entre les taux de Lp(a) et le risque de développement du RAC. Ultérieurement, ces constatations ont été répliquées puis confirmées par deux études indépendantes qui ont révélé un lien causal entre, à la fois, le variant rs10455872 et le RAC ; et entre ce variant et les niveaux de Lp(a) [36, 37]. De plus, Capoulade et ses collègues ont démontré que les niveaux circulants de Lp(a) et les phospholipides oxydés (OxPL-apoB) étaient associés de façon indépendante à la progression du RAC [38]. Par ailleurs, une sous analyse de l'étude ASTRONOMER (Aortic Stenosis Progression Observation : Measuring Effects of Rosuvastatin) a démontré que les niveaux circulants d'OxPL-apoB et Lp(a) sont associés de façon indépendante à la progression rapide du RAC [38]. En outre, chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, les niveaux de Lp(a) sont associés à la calcification de la VA [344]. Pris ensemble, ces études suggèrent une forte association entre la Lp(a) et la progression du RAC.



**Figure 2-9 :** Schéma représentant les mécanismes potentiels et le rôle causal de Lp(a) et OxPL dans le RAC. Les changements moléculaires impliqués dans la progression du RAC. La fibrine exposée aux niveaux de la lésion endothéliale de l'aorte peut se lie à Lp(a), conduisant à sa rétention dans la valve. Les lipides pro-inflammatoires associés au Lp(a), tels que OxPL, peuvent favoriser la calcification et la formation osseuse via les CIVs. ALP : phosphatase alcaline ; ATX : autotaxine ; KIV : kringle de type IV ; KV : kringle type V ; Lp(a) : lipoprotéine(a); LPA : acide lysophosphatidique; LPC : lysophosphatidylcholine; Lp-PLA2 : phospholipase A2 associée aux lipoprotéines; OPG : ostéoprotégérine; OxPL : phospholipides oxydés; ROS : espèces réactives oxygénées; CIV, cellule interstitielle valvulaire. Adapté de : [313].

### ***2.1.6 Principales enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines: Rôle dans le RAC***

Suite à leur infiltration dans la VA, les lipoprotéines peuvent subir des modifications par des enzymes. Il en résulte donc une production de lipides bioactifs qui favorisent l'inflammation et la minéralisation de la VA. En effet, les niveaux d'OxPLs pourraient être modulés par l'intermédiaire des lipides et des enzymes qui sont associés à Lp(a), et aux particules de LDL petites et denses [136]. À cet égard, il a été rapporté que les Ox-PLs, transportés par Lp(a), seront

métabolisés par des enzymes phospholipases pour produire des facteurs proinflammatoires et proathérogènes [109, 306]. D'abord, la **Lp-PLA2** (Lipoprotein-associated phospholipase A2), une enzyme également connue sous le nom de PAF (platelet activating factor) acetylhydrolase, est transportée essentiellement par les LDLs mais aussi sécrétée par les macrophages [100, 103]. Cette enzyme aussi liée avec la Lp(a) assure le clivage des OxPLs en LPC (ou LysoPC) et en acides gras libres OxFFA (oxidized free fatty acid) [38, 345-346]. Il a été rapporté que l'activité enzymatique de Lp-PLA2 était plus élevée dans la fraction Lp(a) comparativement à la fraction LDL [38, 101]. En outre, certaines évidences suggèrent que Lp-PLA2 est impliquée dans les processus inflammatoires qui participent à la pathogenèse du RAC [101, 136].

D'une part, Mahmut et al. ont démontré que l'expression et l'activité enzymatique de Lp-PLA2 sont augmentées dans le RAC [101]. Plusieurs travaux ont également montré que le LPC (Lysophosphatidylcholine), un métabolite hautement réactif, est présent dans les VA calcifiées et agit comme un facteur pro-inflammatoire ayant des propriétés pro-ostéogéniques dans la VA [103-104, 347]. Il est important de noter que le LPC pourrait être généré par des voies non enzymatiques lors de l'oxydation des LDLs [348, 349]. De plus, le traitement des CIVs isolées avec le LPC augmente l'expression de certaines enzymes impliquées dans le processus de minéralisation, telles que ENNP-1, l'ALP (phosphatase alcaline) et le transporteur Pit1/SLC20A1 [101, 136].

D'autre part, nos études histologiques ont révélé que la **LPL** (Lipoprotéine lipase), sécrétée par les macrophages, est surexprimée dans les VA minéralisées. Cette enzyme co-localise avec la décorine, un protéoglycane qui participe à la rétention des lipides dans la VA [94]. Ceci suggère que l'interaction entre LPL et la décorine pourrait augmenter le mécanisme de rétention des lipides. D'ailleurs, le biglycane, un autre protéoglycane est surexprimé dans les VA calcifiées [95], et induit l'activation de TLR2. Ce récepteur favorise à son tour la surexpression de la protéine PLTP (Phospholipid transfer protein) par les CIVs [95]. La PLTP peut se lier au HDL et diminue donc leur capacité de transport inverse du cholestérol.

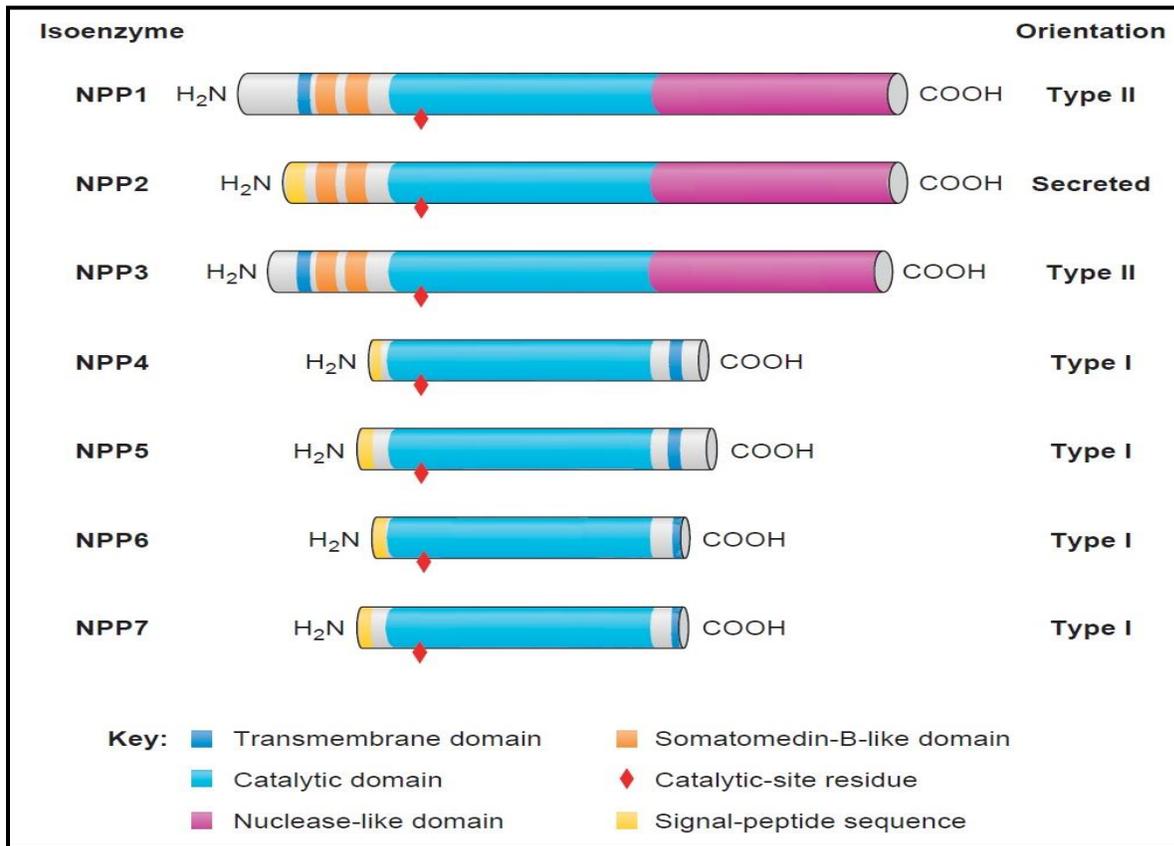
En dernier lieu, une autre enzyme lysophospholipase D, l'**autotaxin (ATX)**, utilise le LPC comme un substrat pour produire de l'acide lysophosphatidique (LPA) [350, 351]. Ce dernier est un médiateur bioactif ayant des propriétés pro-inflammatoires puissantes, et qui agit sur six récepteurs (LPA1-6) différents [352]. Pris ensemble, ces données suggèrent que de nombreuses enzymes sont impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines, notamment la Lp-PLA2 et l'ATX. Ces dernières produisent des lipides bioactifs ayant des propriétés inflammatoires et pro-ostéogéniques qui pourraient contribuer à la progression du RAC.

## 2.2 L'axe Autotaxine (ATX)-Acide lysophosphatidique (LPA)

### 2.2.1 L'autotaxine (ATX)

#### 2.2.1.1 La découverte de l'ATX

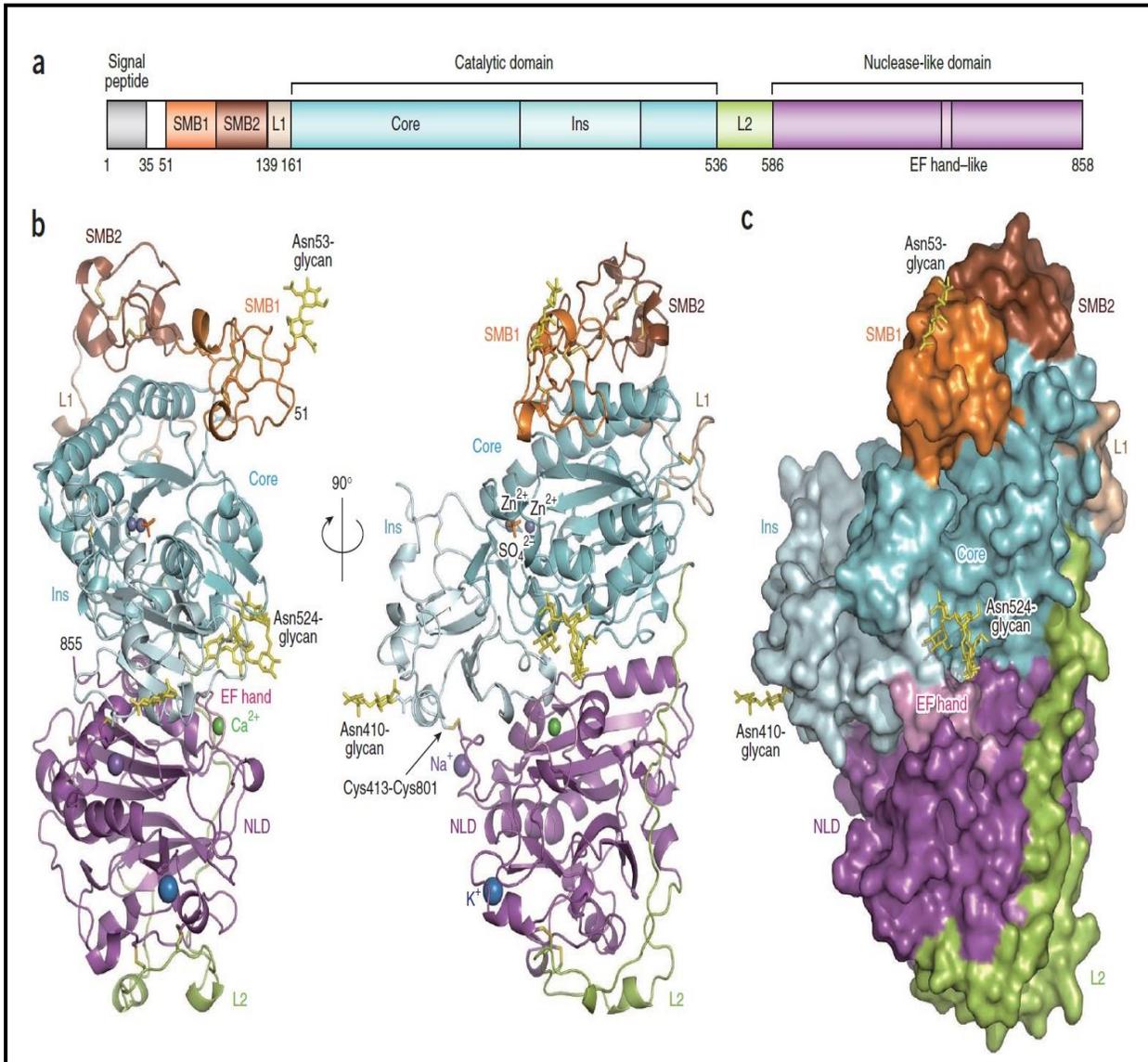
L'ATX est une enzyme sécrétée ayant une activité lysophospholipase D (lysoPLD). Elle est codée par le gène *ENPP2* sur le chromosome 8 (position 8q24.1) chez l'humain, et sur le chromosome 15 chez la souris [335]. Elle appartient à la famille des ectonucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterase qui comporte 7 membres structurellement similaires numérotés en fonction de leur ordre de découverte [180] (Figure 2-10). En général, les NPPs catalysent l'hydrolyse des liaisons 5'-phosphodiester des nucléotides, tels que l'ATP et leurs dérivés, en 5'-nucléotide monophosphates. Par ailleurs, l'ATX se distingue des autres membres de famille ENPPs car c'est la seule protéine qui possède une activité lysoPLD lui permettant de produire de LPA à partir du LPC [180]. Au début, l'ATX avait été identifiée comme un facteur stimulant la motilité des cellules de mélanome A2058 [351,354]. À cet égard, le nom *autotaxine* provient du fait que cette enzyme favorise la chimiotaxie chez les cellules de mélanome d'une manière autocrine "motility stimulating factor". En 1986, une activité lysoPLD permettant la synthèse extracellulaire de LPA a été décrite dans le plasma de rat [355]. Quelques années plus tard (en 1992), l'ATX était caractérisé comme une glycoprotéine sécrétée de 125 kDa [354]. Ce n'est qu'en 2002 que l'activité lysoPLD plasmatique a été reconnue en tant que ATX [351,354,356].



**Figure 2-10 :** Structure des principaux membres de la famille des ENPPs. Les trois membres des ENPPs ont un domaine catalytique homologue. Seule ENPP2 possède un peptide signal (en NH<sub>2</sub>) et est donc sécrétée dans le milieu extra-cellulaire. ENPP1 et 3 sont ancrés à la membrane plasmique. Tiré de : [180].

### 2.2.1.2 Structure et fonction catalytique de l'ATX

Structurellement, l'ATX est formé par un domaine transmembranaire court qui sépare la petite extrémité N-terminal de la grande partie du polypeptide. La courte extrémité N-terminal interagit avec la membrane pour réguler la libération d'ATX dans l'espace extracellulaire. Ainsi, la majeure partie de l'enzyme est composée de deux domaines semblables à la Somatomedine B appelé aussi **SMB-like domains (SMB1 et SMB2)** situés à sa partie N-terminale, d'un **domaine catalytique central phosphodiesterase (PDE)** et un **domaine *nuclease-like*** catalytiquement inactif situé à l'extrémité C-terminale [357, 358] (Figure 2-11).



**Figure 2-11 :** Représentation schématique de l'autotaxine. (a) Organisation des domaines d'ATX. (b) Diagramme en ruban de la structure ATX sous forme libre. (c) Représentation en surface de la structure ATX sous forme libre. Somatomedin B-like domain 1 (SMB1), orange; SMB2, marron; sous-domaine de base, cyan; insertion (Ins) sous-domaine, cyan clair; domaine de type nucléase ou nuclease-like domain (NLD), magenta; L1, beige; L2, jaune-vert; Motif EF semblable à une main, rose. Les N-glycanes et l'ion sulfate sont représentés par des bâtonnets jaunes et oranges, respectivement. Les ions  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  et  $K^+$  sont représentés respectivement par des sphères grises, vertes, violettes et bleues. Les 15 liaisons disulfures sont représentées sous la forme de bâtonnets. Tiré de : [360].

D'abord, **les domaines SMBs** sont des courtes séquences peptidiques riches en cystéine qui partagent une grande homologie structurale avec le domaine SMB de la vitronectine (protéine matricielle) [359, 360]. Cette dernière est une protéine essentielle à la fixation de PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1). Cependant, les domaines SMBs d'ATX ne présentent aucune affinité pour PAI-1. Ces domaines maintiennent les ponts disulfures intramoléculaires qui caractérisent la molécule d'ATX [359]. En outre, SMB2 contient un motif RGD formé par un tripeptide (Arg-Gly-Asp) [361]. Étant donné que les domaines SMBs sont à proximité d'un canal hydrophobe reliant le site catalytique à l'environnement externe, ces domaines agissent comme un pont entre l'ATX et l'espace extracellulaire. Ainsi, des études *in vitro* sur les plaquettes ont démontré que les domaines SMBs et les intégrines sont indispensables pour l'interaction de l'ATX avec les plaquettes [363].

En deuxième lieu, le **domaine catalytique PDE** (environ 400 acides aminés) est localisé au centre de la structure linéaire d'ATX. Ce domaine interagit avec les deux domaines SMBs d'un côté et avec le domaine nucléase du côté opposé. Ainsi, le domaine PDE contient une poche hydrophobe profonde au quelle se lie le substrat lipidique. Il est donc responsable de l'activité lysoPLD et phosphodiesterase d'ATX. De ce fait, des études ont montré qu'une mutation au niveau d'un seul acide aminé (Thréonine210) a provoqué la perte de ces deux activités [364]. De plus, plusieurs évidences ont démontré que le domaine catalytique de l'ATX présente des similarités avec le domaine catalytique des phosphatases alcalines [180, 365]. Bien que l'activité PDE soit beaucoup plus faible que l'activité lysoPLD, c'est la disponibilité du substrat (LPC ou ATP) qui oriente et régule l'activité enzymatique de la protéine [366].

Finalement, **le domaine nucléase** située en C-terminal possède une séquence très similaire à celle de certaines endonucléases. Cependant, l'ATX n'a aucune activité nucléase. Le domaine nucléase facilite la stabilisation de la réaction catalytique par la liaison directe au calcium ( $Ca^{2+}$ ), et par la formation de ponts disulfures avec le domaine PDE [367]. Par ailleurs, des expériences de mutagenèse dirigée suggèrent que ce domaine joue un rôle essentiel dans la structure tridimensionnelle, la localisation cellulaire et la sécrétion de l'ATX [180, 368]. D'autres études ont révélé un rôle primordial du domaine nucléase dans la stabilisation de la protéine et le ciblage membranaires d'ATX [369]. En outre, au centre de ce domaine il existe un motif EF-hand (EF hand-like motif) qui fonctionne indépendamment de l'activité d'ATX [370]. Des études ont démontré que le motif EF-hand n'est pas lié à l'activité lysoPLD d'ATX mais plutôt impliqué dans le développement d'oligodendrocytes grâce à un mécanisme inconnu [370]. Ces motifs EF-hand

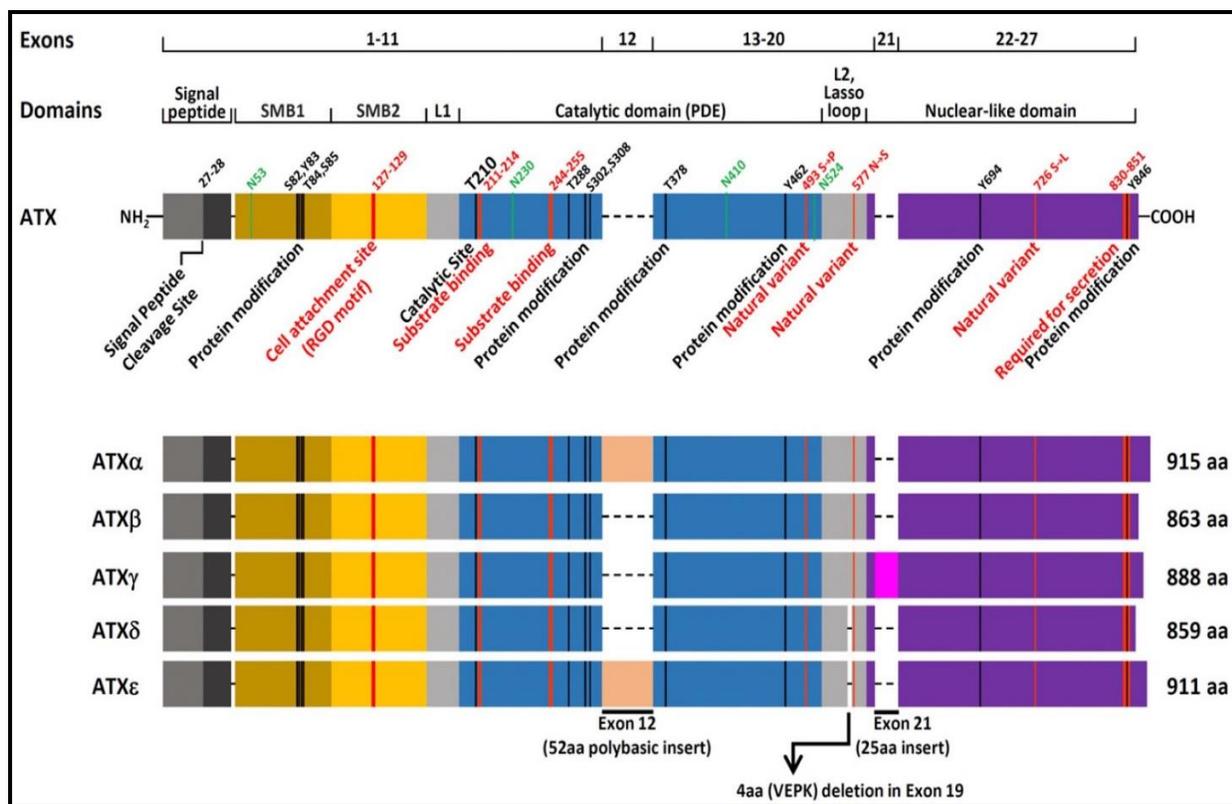
sont couramment impliqués dans la liaison du calcium aux protéines. Cependant, l'activité catalytique d'ATX qui nécessite des ions ( $\text{Ca}^{++}$ ) est indépendante de ce motif [371, 372]. Bien que le domaine nucléase et les domaines SMBs jouent un rôle fondamental dans l'activité lysoPLD [368], leur rôle demeure encore mal défini. En dernier lieu, il est à noter que l'ATX est une protéine glycosylée et que le niveau de glycosylation joue un rôle important dans la régulation de son activité lysoPLD. En effet, trois sites potentiels de N-glycosylation ont été identifiés sur ATX : N410, N524, et N53 [373]. Sur ce point, des études de mutagenèse démontrent que la glycosylation N524, un résidu conservé du domaine catalytique, est essentielle pour l'activité d'ATX [373, 374].

### ***2.2.1.3 Les isoformes et le profil d'expression de l'ATX***

#### ***✚ Les isoformes majeures de l'ATX***

La structure du gène *ENPP2* qui code pour l'enzyme ATX est identique et à la fois très complexe chez l'homme et la souris. Ce gène, constitué de 27 exons et 26 introns, subit plusieurs épissages alternatifs et aboutira à la formation de trois principales isoformes d'ATX. Ce sont les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  qui sont exprimées différemment dans les tissus [375] (Figure 2-12).

D'abord, l'**isoforme  $\alpha$**  est isolée à partir de cellules de mélanome. Il est formé de 925 acides aminés grâce à une insertion de 52 acides aminés basiques au niveau de l'exon 12 [357, 376]. Bien que la fonctionnalité de cette insertion demeure inconnue, il a été suggéré que ce domaine basique interagit avec les protéines de la MEC et favorise l'acheminement de l'ATX au niveau matriciel [376, 377]. Ensuite, l'**isoforme  $\beta$**  est formée d'une chaîne polypeptidique de 863 acides aminés ; c'est la variante la plus exprimée [357]. Contrairement à ce qui a été décrit chez l'homme, l'isoforme  $\beta$  est fortement exprimée dans le système nerveux central et les tissus périphériques de chez la souris [375]. En outre, l'isoforme  $\beta$  a été initialement clonée à partir des cellules humaines de tératocarcinome NterD1 [377] puis isolée à partir des tissus de souris [357]. Enfin, l'**isoforme  $\gamma$**  possède un niveau d'expression très faible par rapport aux autres variantes d'ATX. Chez l'homme, il est composé de 889 acides aminés et contient une insertion de 24 résidus à côté du domaine nucléase [375]. Dans le système nerveux central, l'isoforme ATX $\gamma$  est exprimée à des niveaux similaires dans toutes les régions du cerveau [375]. Toutefois, l'ATX $\gamma$  est localisé principalement dans les oligodendrocytes [375].



**Figure 2-12 :** Structure des différentes isoformes de l'autotaxine. Les isoformes d'ATX sont composées de deux domaines somatomedine-B, d'un domaine catalytique contenant le site actif en position T210 et d'un domaine nucléase. La longueur totale de chaque isoforme et les principales caractéristiques structurales sont identifiées. La région fonctionnelle putative et les variantes naturelles sont surlignées en rouge. Les résidus clés d'asparagine sont surlignés en vert. L'exon 12 code pour un insert clivable polybasique de 52 acides aminés qui permet le recrutement d'ATX sur la membrane plasmique via l'interaction avec des protéoglycanes héparane sulfate. Tiré de Tiré de : [357].

Deux autres isoformes d'ATX ont été récemment décrites par le groupe Aoki et ses collaborateurs : **ATXδ** et **ATXε** [362]. Ces derniers sont identiques à l'isoforme β à l'exception de l'excision de quatre acides aminés dans la région « L2 linker » de ces deux isoformes et l'insertion de 52 acides aminés au niveau dans le domaine PDE de l'ATXε [362] (figure 2-12).

Les différences structurales majeures entre les isoformes ATXδ et ATXε résultent d'une délétion de quatre acides aminés (VEPK) dans l'exon 19 et l'insertion de 52 acides aminés dans l'exon 12 [357,375,362]. De même, l'épissage alternatif au niveau des exons 12 et 21 et/ou la présence d'introns (> 20) pourrait générer soit l'isoformes α, β ou γ. La délétion des exons 12 et 21, de

l'exon 12 ou de l'exon 21 génère respectivement l'isoforme  $\beta$ ,  $\alpha$  et  $\gamma$  [362]. L'identité et la signification fonctionnelle des facteurs régulant l'épissage alternatif des exons 12 et 21, ainsi que la délétion du peptide VEPK dans la boucle lasso (lasso loop), restent à déterminer. Il est à noter que les cinq isoformes d'ATX présentent des différences au niveau des paramètres enzymatiques, des niveaux d'expression tissulaire et dans la stabilité [375]. Les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  de l'ATX sont exprimées d'une manière différentielle dans de nombreux types cellulaires et tissus [358]. Par exemple, l'ATX  $\beta$  est l'isoforme la plus abondante trouvée dans le plasma, alors que l'ATX  $\alpha$  est la moins exprimée dans les tissus périphériques [357].

### **Profil d'expression de l'ATX**

Le profil d'expression de l'ATX est assez vaste. Chez l'adulte, une forte expression d'ATX a été observée dans le placenta, les ovaires, les intestins [375], les reins et le cerveau [378]. Aussi, l'ATX a été détectée dans le tractus intestinal [379], dans les milieux conditionnés de mélanomes [354], de mastocytes [379] ou d'adipocytes [380]. En effet, lorsqu'ils sont différenciés, les cellules cancéreuses (les cellules du mélanome ou du glioblastome, les lignées adipocytaires 3T3-F442A et 3T3L1) présentent un niveau d'expression élevé d'ATX [354, 380]. De plus, l'ATX a été signalée dans la plupart des fluides biologiques, notamment les liquides péritonéaux [381], le liquide céphalo-rachidien [382], le plasma et le sérum de diverses espèces [356], ainsi que dans l'urine et les sérosités provenant de vésicules cutanées [351, 383-384].

Par ailleurs, la transcription du gène *ENPP2* dépend de plusieurs facteurs de transcription tels que NFATC1 (Nuclear Factor of Activated T-cells 1), NF- $\kappa$ B, HOXA13 et l'oncogène v-Jun [385-387]. D'une part, l'expression de l'ATX est stimulée par certains facteurs de croissance comme le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le EGF (Epidermal Growth Factor), BMP2, Wnt-1 et TNF $\alpha$ . D'autre part, son expression est inhibée par le TGF- $\beta$  et certaines cytokines telles que IL-1, IL-4 et IFN- $\gamma$  [388]. Il est important de noter que la régulation de l'expression d'ATX dépend du type et du contexte cellulaire.

En dernier lieu, l'ATX est dysrégulée dans certains cancers. Par exemple, dans le cas du cancer du sein, Chen et ses collaborateurs ont révélé que l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  régulait l'expression de l'autotaxine en agissant sur NFATC1 [389]. Aussi, une surexpression de l'ATX a été observée lors de la transformation des fibroblastes de poulets par l'oncoprotéine v-Jun [387]. L'ensemble de ces données suggère que l'ATX est impliquée dans les processus inflammatoires et le cancer.

#### 2.2.1.4 *Activité enzymatique de l'ATX*

##### *Caractéristique de l'activité enzymatique de l'ATX*

La spécificité du substrat au niveau du noyau catalytique d'ATX est large. De ce fait, l'ATX peut avoir deux types d'activité enzymatique : une activité **lysoPLD (lysophospholipase D)** et une activité **PDE (phosphodiesterase/pyrophosphatase)**.

Premièrement, l'**activité PDE** de l'ATX consiste en l'hydrolyse de nucléotides triphosphates (ATP ou GTP) et à la libération de pyrophosphate (PPi) et de phosphate inorganique (Pi) [390]. En effet, l'ATX hydrolyse les liaisons 5'-phosphodiester des oligonucléotides, et agit comme une ATPase/GTPase qui catalyse la conversion des ATP en AMP. L'ATX fonctionne donc comme une ATP pyrophosphatase en éliminant tout le groupe pyrophosphate des molécules de nucléoside phosphate [376]. Le résidu de thréonine (T210) au milieu du domaine catalytique PDE sert de point de liaison transitoire des réactions intermédiaires [390]. Il est à noter que l'activité PDE de l'ATX est faible voir marginale.

Dix ans après sa découverte initiale, l'ATX a été purifiée. Une activité **lysoPLD** de l'ATX avait été décrite dans le plasma humain et chez le rat [351, 354, 355, 356, 357]. Cette activité enzymatique catalyse l'hydrolyse de la liaison phosphoester distale qui relie le monoacylglycérol-phosphate au groupement choline de lysophospholipide [351, 356]. Grâce à cette activité lysoPLD, l'ATX hydrolyse la LPC pour produire de l'acide lysophosphatidique (LPA), un lipide bioactif impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques clés [351-352, 357]. En dernier lieu, l'abondance des substrats et la disponibilité de co-facteurs sont des facteurs qui influencent la vitesse de l'activité ATX [391]. De plus, le LPC, présent en grande quantité dans le plasma et le sérum (>100µM) [392], est connu comme le substrat majoritaire de l'ATX. Par conséquent, l'ATX présente une affinité plus forte pour le LPC qu'aux nucléotides [351].

##### *L'activité d'ATX : une source majeure du LPA*

La production de LPA par l'ATX a été prouvée par de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. En effet, des études effectuées chez la souris ont démontré que l'hydrolyse du LPC par l'ATX est la source majeure du LPA dans le sérum. Par ailleurs, les souris invalidées pour le gène de l'autotaxine (*Enpp2*<sup>-/-</sup>) ne sont pas viables [393]. Les études ont démontré que ces souris meurent au stade embryonnaire à cause de graves défauts au niveau du tube neural, et l'incapacité à former leur propre réseau vasculaire [393, 394]. Cependant, les souris hétérozygotes déficientes en ATX (*Enpp2*<sup>+/-</sup>) survivent. Ces souris ont une réduction d'environ 50% de l'ATX et des concentrations en LPA circulant deux fois moins élevée que la normale [394]. Par conséquent, l'ATX est la source

majeure de LPA dans le sérum [394, 395]. De plus, l'ATX peut catalyser aussi la synthèse de sphingosine-1-phosphate (S1P), un autre lysophospholipide médiateur de diverses activités biologiques, à partir de sphingophosphorylcholine (SPC) [396]. En revanche, la production plasmatique du S1P par ATX a été décrite seulement *in vitro* ; mais sa synthèse *in vivo* est un sujet controversé [396]. Finalement, des évidences démontrent que l'autotaxine pourrait avoir une activité de transphosphatidylase. Cette activité catalyse la synthèse d'acide phosphatidique cyclique (cPA), un analogue du LPA, à partir du LPC en utilisant le résidu hydroxy en position sn-2 [395]. Il est évident que cette activité de transphosphatidylase est très faible comparativement à l'activité lysoPLD car l'ATX produisait quatre fois plus de LPA que de cPA [395].

### **✚ Régulation de l'activité enzymatique de l'ATX**

Étant donné que les taux de LPC sont très abondants dans le plasma (>100  $\mu\text{M}$ ) et malgré que l'ATX est constitutivement active, les taux plasmatiques de LPA sont relativement faibles (environ 0.1-0.5  $\mu\text{M}$ ). Deux possibilités peuvent expliquer ce paradoxe. Premièrement, l'élimination du LPA par le foie est l'un des mécanismes potentiels impliqués dans la dégradation de ce lipide dans le plasma [318]. Deuxièmement, le LPA néosynthétisé pourrait être dégradé très rapidement par les lipides phosphate phosphatases (LPPs) associées aux membranes cellulaires [397]. Ces enzymes peuvent ainsi limiter l'accumulation de LPA dans le plasma [398]. Aussi, les lipides bioactifs générés (LPA et S1P) peuvent exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activité enzymatique d'ATX [399]. De plus, le LPA peut réguler sa propre synthèse et empêcher toute accumulation excessive dans le plasma. En effet, l'ATX se lie plus fortement au LPA (à longues chaînes 18:1 ou 16:0) ou la S1P qu'au LPC. Ces évidences peuvent expliquer en grande partie les faibles taux plasmatiques de LPA par rapport aux taux de LPC. Par ailleurs, des travaux ont montré que l'ATX peut s'associer également aux intégrines des cellules vasculaires et aux plaquettes via son domaine SMB [398]. Cette interaction ATX-intégrine facilite l'accès de l'enzyme aux substrats lysophospholipides de surface cellulaire, et permet de délivrer le LPA au voisinage de ses récepteurs [398, 363]. L'albumine (Bovine Serum Albumin ou BSA) joue également le rôle d'un transporteur plasmique du LPA et la S1P [399]. À cet égard, l'activité de l'ATX est fortement inhibée par la BSA à des concentrations supérieures à 50  $\mu\text{g/ml}$  (0,75  $\mu\text{M}$ ) [399]. Par contre, l'étude a constaté que la forme sans lipide de l'albumine (delipidated BSA) n'avait pas d'effet sur l'activité de l'ATX [399]. Cela peut limiter le taux de LPA dans le plasma.

### 2.2.1.5 Les inhibiteurs de l'ATX

#### ✚ Les inhibiteurs chimiques

L'ATX a été impliquée dans plusieurs pathologies graves, notamment le cancer, l'inflammation chronique, ainsi que les maladies fibrotiques et l'arthrite [352, 358, 400-403]. Au cours des dernières années, de nombreuses recherches ont été effectuées afin de découvrir des inhibiteurs pharmacologiques puissants et sélectifs pour cette enzyme [404]. À cet égard, une variété de composés synthétiques ayant des structures chimiques diverses, dont BrP-LPA, FTY720, S32826, HA130 et PF-8380 ont été développés comme inhibiteurs d'ATX [405].

Premièrement, plusieurs classes d'analogues du LPA ont été développées puis utilisées comme des molécules capables d'inhiber l'ATX sans avoir un impact sur les récepteurs du LPA. Par exemple, le **cPA** (1-acyl-sn-glycerol-2,3-cyclic phosphate) est un analogue naturel du LPA présent dans le sang et le cerveau des mammifères [406]. Le cPA et ses analogues synthétiques, 3ccPA, inhibent l'activité lysoPLD de l'ATX d'environ 70%. Ainsi, d'autres analogues du LPA tels que le « Alpha-substituted phosphonate » et le « Fatty alcohol phosphates » ont été identifiés comme des inhibiteurs compétitifs qui bloquent de manière sélective l'activité lysoPLD de l'ATX [407, 408]. Deuxièmement, l'un des premiers composés déclarés comme un inhibiteur puissant de l'activité ATX était le **FTY720** [405]. C'est un immuno-modulateur qui permet la dégradation des récepteurs de S1P1. En effet, des études chez la souris ont démontré que lorsqu'il est phosphorylé, le **FTY720** bloque l'action de l'ATX diminuant ainsi les taux plasmatiques de LPA [409]. En outre, certains dérivés de pipéridine et de pipérazine ont été réclamés comme inhibiteurs de l'ATX [405]. En effet, le **PF-838053** est reconnu par son efficacité *in vivo* [410]. Cet inhibiteur agit avec une faible  $IC_{50}$  de 2,8 nM sur l'ATX purifiée, et une  $IC_{50}$  de 101 nM lorsqu'il est utilisé dans du plasma humain. De ce fait, il a été démontré que l'administration *per os* de PF-838053 (dose de 30 mg/kg) chez le rat provoque une réduction de LPA jusqu'à 95% ainsi qu'une diminution de l'hyperalgésie inflammatoire après trois heures [405, 410].

En 2008, Ferry M et al. ont mis en évidence un phosphonate aromatique, le **S32826**. C'était le premier composé capable de réduire significativement l'activité lysoPLD de l'ATX *in vitro* avec une  $IC_{50}$  de 1 nM [411]. Bien que le S32826 a montré une efficacité sur la prolifération de cellules tumorales en culture, il n'est pas utilisable *in vivo*. En effet, ce composé possède une structure fortement hydrophobe qui diminue sa solubilité et stabilité dans les milieux aqueux [411]. Cependant, des dérivés du S32826 modifiés ont été synthétisés afin d'améliorer sa solubilité et de réduire son hydrophobicité. Ces derniers ont permis une meilleure inhibition de l'ATX [412].

En dernier lieu, des molécules à base d'acide boronique, tel que le **HA130**, ont aussi été développées puis testées à la fois *in vitro* et *in vivo* [413]. En effet, l'injection de HA130, une thiazolidinedione contenant un acide boronique, chez la souris a entraîné une chute rapide des taux circulants de LPA [413]. En outre, l'administration intraveineuse de l'inhibiteur HA130 chez la souris (IC<sub>50</sub> de 30 nM) bloque l'activité de l'ATX et réduit de façon sélective les taux plasmatiques de LPA [414]. Néanmoins, l'utilisation de HA130 est limitée *in vivo* par le fait que cet inhibiteur possède une courte durée demi-vie dans le sang (à peu près 3 min) [413, 414].

Enfin, malgré les grands intérêts pour l'axe LPA-ATX, un seul inhibiteur de l'ATX, le **GLPG1690**, a progressé jusqu'à des essais cliniques [415, 416]. Cet inhibiteur, développé par Galapagos, est considéré comme un inhibiteur efficace de l'ATX chez la souris et chez l'humain. En effet, le GLPG1690 agit avec une IC<sub>50</sub> de 224 nM et 131 nM chez la souris et l'humain respectivement [415, 416]. L'administration *per os* de GLPG1690 chez un modèle murin de tabagisme a entraîné une baisse de l'inflammation [417]. Il est important de mentionner que cet inhibiteur est actuellement en essais cliniques (phase II) contre la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF) [415]. Dans l'ensemble ces études suggèrent que l'utilisation d'inhibiteurs d'ATX semble être une stratégie intéressante pour créer de nouvelles thérapies et des agents médicaux anti-cancéreux, anti-inflammatoires et anti-fibrotiques.

### ***2.2.2 L'acide lysophosphatidique (LPA)***

Le LPA est un glycérophospholipide naturel simple. Pendant longtemps ce dernier a été considéré comme un intermédiaire métabolique transitoire de la synthèse des glycérolipides et de phospholipides telle que la phosphatidylcholine. En 1963, W. Vog et al. ont démontré que le LPA est un lysophospholipide bioactif impliqué dans la prolifération cellulaire et la contraction de CMLs de lapin (agent vasoconstricteur) [418]. Ainsi, ce phospholipide a été impliqué dans un large spectre d'activités biologiques, notamment la survie, la migration et l'apoptose cellulaire ainsi que l'agrégation plaquettaire [419-421].

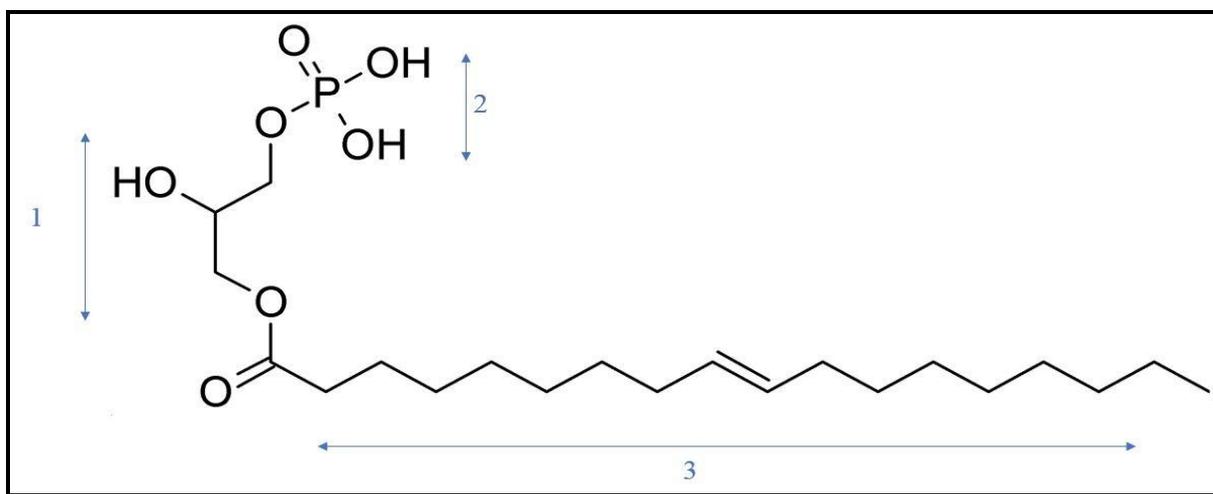
#### ***2.2.2.1 Structure biochimique du LPA***

Le LPA est composé d'un squelette glycérol-phosphate possédant un groupement hydroxyle en position sn-2 ou sn-1, un acide gras (AG) et un groupement phosphate libre en position sn-3 (Figure 2-13) [420]. L'AG est attachée en position 1 ou 2 sur le glycérol par l'intermédiaire d'une liaison acyl, alkyl ou alkényl.

Il existe différentes formes de LPA qui diffèrent par la longueur de la chaîne carbonée et dépendent de la nature de l'AG, saturé (C18:0 ; 16:0) ou insaturé (C18:1; C20:4) [420, 421]. En effet, ces espèces sont retrouvées de façon très abondante dans les liquides biologiques chez les mammifères. [352].

**Figure 2-13 :** Schéma représentant l'acide lysophosphatidique (LPA). Le LPA est un lysophospholipide composé d'un squelette de glycérol (1), d'un groupement phosphate (2) et d'une chaîne d'acide gras (3). Il peut être saturé ou insaturé et greffé en position 1 ou 2 sur le glycérol. Adapté de [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lysophosphatidic\\_acid.PNG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lysophosphatidic_acid.PNG).

### 2.2.2.2 Le LPA dans les liquides biologiques



Tout d'abord, la concentration plasmatique de LPA est de l'ordre du nanomolaires (100nM) mais elle peut atteindre quelque micromolaires dans le sérum (1-5  $\mu$ M) [422]. Étant donné que les niveaux de LPA sérique sont plus élevés que les niveaux de LPA plasmatique, le sérum produit lors de l'activation plaquettaire est la source majeure de LPA [423]. Ce lysophospholipide a été également détecté dans plusieurs fluides biologiques tels que la salive [424], l'urine [383], les fluides péritonéaux [381], le liquide lacrymal [425], le liquide folliculaire, et associé aux lipoprotéines [426]. En plus des plaquettes activées, le LPA peut être libéré par d'autres cellules telles que les fibroblastes, les cellules épithéliales, les adipocytes [426], les érythrocytes. De plus, certaines cellules cancéreuses sont aussi à l'origine de la production de LPA [427]. En second lieu, plusieurs études ont démontré que le taux sérique ou plasmatique de LPA augmente dans certaines pathologies, notamment le myélome [428], l'hépatite C [401], l'insuffisance rénale [429], et le cancer ovarien [430]. Par ailleurs, le LPA a été identifié dans de nombreux fluides pathologiques comme les ascites ovariennes [430], les fluides d'arthrite [431, 432] ou d'atteintes cutanées [432].

Il est important de noter que le LPA est maintenu en solution grâce à sa liaison avec l'albumine qui lui sert de véhicule. Il peut être associé à d'autres protéines cytosoliques et/ou des lipoprotéines de faibles densités [433].

### 2.2.2.3 La synthèse de LPA

Le LPA est produit au niveau intracellulaire, mais il peut être également synthétisé dans le compartiment extracellulaire. En raison de sa nature polaire, sa diffusion transmembranaire semble peu probable. Sachant qu'aucun transporteur de LPA n'a été décrit jusqu'à ce jour, la présence de LPA à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule doit donc résulter de productions intracellulaires et extracellulaires distinctes.

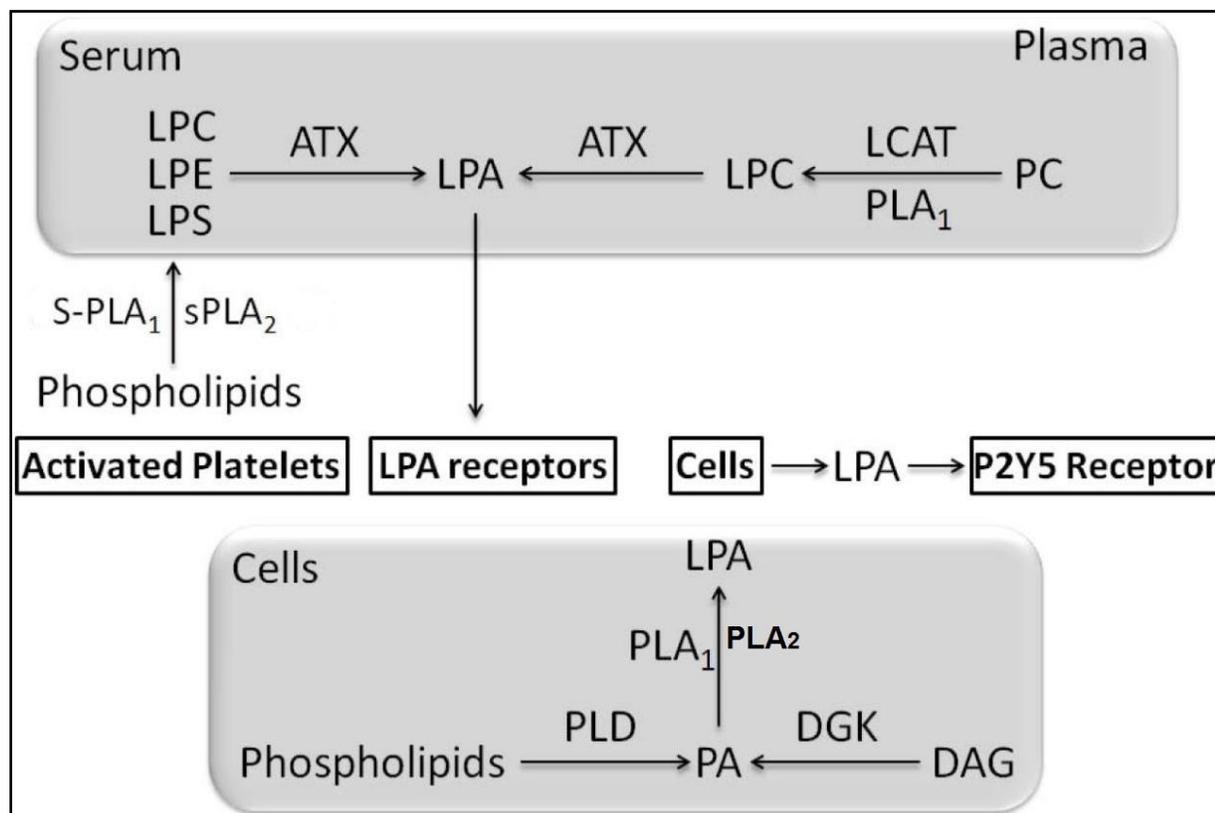
#### **Synthèse intracellulaire de LPA**

En intracellulaire, la synthèse de LPA constitue l'étape primaire et commune de la biosynthèse des triglycérides et de certains phospholipides. Deux voies majeures de synthèse intracellulaire de LPA sont distinguées. Premièrement, le LPA intracellulaire peut être produit à partir de l'acide **phosphatidique (PA)** présent dans les microvésicules membranaires. Ce dernier est généré à partir de **phospholipides** ou de **diacylgérol (DAG)**, par la **phospholipase D (PLD)** ou la **diacylgérol kinase (DGK)** respectivement. En effet, l'enzyme **DGK** catalyse la formation du PA à partir du **DAG**, lui-même issu d'une enzyme, la **phospholipase C (PLC)**. Le PA peut également provenir de l'hydrolyse de la **phosphatidylcholine (PC)** membranaire sous l'action de **PLD**. Les PAs générés seront ensuite convertis en **LPA** sous l'action d'une **phospholipase A2 sécrétée (sPLA2)** [438, 435, 436] (Figure 2-14). Par ailleurs, une enzyme, la **mono-acyl glycérol kinase (MAGK)** peut également catalyser la phosphorylation du **mono-acyl glycérol (MAG)** et conduit ainsi à la production de LPA [437]. De plus, la synthèse de LPA peut s'effectuer à partir du **glycérol-3P (G3P)** via une activité **glycérol-3P acyl transférase (GP3AT)** [434].

Deuxièmement, le LPA peut provenir de l'hydrolyse de la **LPC** sous l'action d'une activité lysoPLD de l'**ATX** [436, 439, 440] (Figure 2-14). La LPC est générée également par hydrolyse de la **phosphatidylcholine (PC)** membranaire sous l'action de **sPLA2**. Cette voie, qui se déroule essentiellement dans le sang, serait la principale voie responsable de près de la totalité du LPA circulant [50-352].

## ✚ Synthèse extracellulaire de LPA

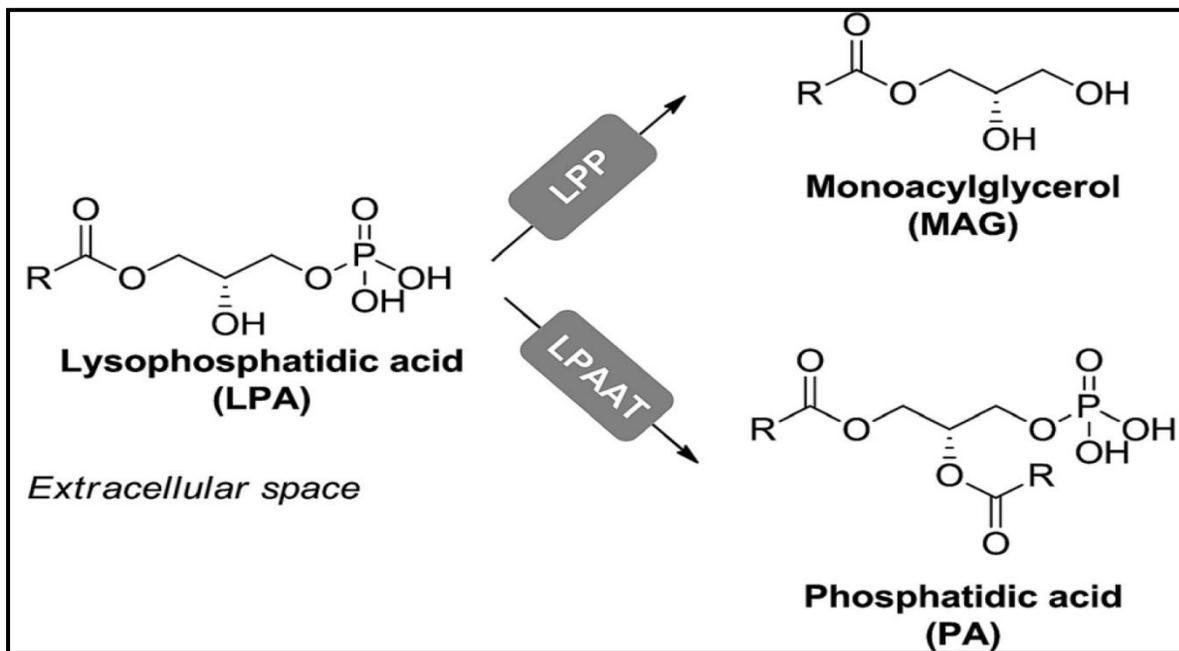
Au niveau extracellulaire, la production du LPA se fait principalement sous l'action de **phospholipase A1 sécrétée (sPLA1)** ou la **cholesterol acyltransferase (LCAT)** suivie de l'action de l'**ATX**. En effet, lors de l'agrégation plaquettaire, une grande quantité de PA est relarguée puis prise en charge par des sPLA1 conduisant à la synthèse de LPA. En outre, les plaquettes agrégées génèrent également de nombreux lysophospholipides (LPC ou LPE) qui seront transformés en **LPA** sous l'action de l'ATX [436, 439].



**Figure 2-14 :** Les voies de synthèse du LPA : Le LPA intracellulaire peut être généré soit à partir de l'acide phosphatidique (PA) via l'action d'une phospholipase A2 sécrétée (sPLA2) ou la phospholipase A1 (sPLA1). Le PA peut être formé à partir des lysophospholipides (LPLs), tels que la lysophosphatidylcholine (LPC), lyso-PE (LPE) ou LPS, suivi de l'action de l'ATX (activité lysoPLD). Le LPA intracellulaire est également produit à partir du PA qui est généré à partir de phospholipides ou diacylgérol (DAG) par la phospholipase D (PLD) ou la diacylgérol kinase (DGK) respectivement. Le LPA extracellulaire peut être généré par l'action séquentielle de la lécithine: cholestérol acyltransférase (LCAT) (ou PLA<sub>1</sub>) puis par l'activité de l'ATX. Adapté de : [529].

#### 2.2.2.4 Dégradation du LPA

Chez la souris la demi-vie du LPA plasmatique est courte (environ 3 minutes). Cela est expliqué par la présence de mécanismes de dégradation importants qui agissent parallèlement à la synthèse du LPA [441]. Premièrement, le foie joue un rôle important dans le catabolisme de LPA. En effet, l'élimination du LPA par le foie est l'un des mécanismes principaux responsables de sa courte demi-vie dans le plasma [318]. Deuxièmement, la dégradation du LPA est due principalement à sa déphosphorylation en monoacylglycérol (MAG). Cette voie est catalysée par des enzymes de la famille des lipides-phosphates phosphatase (LPPs) [441] (Figure 2-15). Ces enzymes déphosphorylent les phospholipides ayant un phosphate libre tels que le LPA, le PA et la S1P [397-399]. Elles sont responsables de la dégradation de plus de 90 % des molécules LPA en circulation. Ces enzymes transmembranaires possèdent un site catalytique situé à la face externe de la membrane cellulaire [442].



**Figure 2-15 :** Les voies de dégradation de l'acide lysophosphatidique. LPP : Lipide-phosphate phosphatase; LPAAT : LPA-acyltransférase. Tiré de : [447].

Par ailleurs, l'inactivation du gène *Lpl1a* chez la souris a provoqué une hausse des taux plasmatiques de LPA [441]. Ces études suggèrent que les LPPs sont les principales enzymes impliquées dans la régulation et le contrôle du LPA. Enfin, certaines études indiquent que d'autres enzymes de la famille des sEH (Epoxyde Hydrolases solubles) sont aussi capables de dégrader le

LPA [443]. En effet, des travaux *in vitro* ont démontré que le sEH permet la déphosphorylation de LPA via son activité phosphatase. Son activité était supérieure aux LPPs [443].

#### ***2.2.2.5 Les récepteurs de LPA et leurs voies de signalisation***

Au début, la fonction du LPA était considérée comme un précurseur ou un métabolite impliqué dans la biosynthèse des phospholipides membranaires. Ce n'est qu'en 1960 que plusieurs groupes ont découvert qu'il ne s'agit pas seulement d'un intermédiaire de synthèse des lipides, mais plutôt une molécule de signalisation ayant diverses actions biologiques [419, 426, 438]. Les effets cellulaires du LPA sont médiés par des récepteurs couplés à des protéines G hétérotrimériques présentes à la surface cellulaire nommés GPCRs (G-protein coupled receptors). En effet, en se fixant sur ces récepteurs, le LPA extracellulaire est capable d'activer de nombreuses voies de signalisations intracellulaires. À ce jour, il existe **six récepteurs** à sept domaines transmembranaires qui sont spécifiques aux LPA (LPA receptors 1-6 ou LPAR1-6) [352, 402]. Ces derniers peuvent être classés en deux sous-groupes selon leur structure primaire : Premièrement, les récepteurs classiques les mieux caractérisés sont **LPAR1, 2 et 3**. Ces récepteurs qui appartiennent à la famille EDG (Endothelial Differentiation Gene) sont des récepteurs de la même famille que ceux de S1P, un autre médiateur lipidique. Deuxièmement, il y a les récepteurs **LPAR4, 5 et 6** qui font partie de la famille des récepteurs purinergiques [352, 444] (Tableaux 2-2)

Receptor	Other name	G protein	Signaling	Knock-out/ mutation
LPA1	Edg2 Vzg1	G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub> , G <sub>12/13</sub>	Erk, ACinh, PLC, Rho, Rac, AKT	CNS, nerves, fibroblasts
LPA2	Edg4	G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub> , G <sub>12/13</sub>	ERK, ACinh, cAMP, PLC, Ca <sup>++</sup> , Rho, AKT	Signaling
LPA3	Edg7	G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub>	ERK, ACinh, cAMP, PLC, Ca <sup>++</sup>	Embryo
LPA4	GPR23 p2y9	G <sub>s</sub> , G <sub>q/11</sub> , G <sub>12/13</sub> , G <sub>i/o</sub>	cAMP, Rho, Ca <sup>++</sup> , PI3Kinh	Increased motility
LPA5	GPR92	G <sub>q</sub> , G <sub>12/13</sub> , G <sub>s</sub>	cAMP, PLC, Ca <sup>++</sup>	–
LPA6	GPR87 p2y family			?
LPA7	p2y5		cAMP	Hair growth
LPA8	p2y10			
PPAR $\gamma$	–	–	Transcription factor	Lethal

**Table 2-2** : Rôles des différents récepteurs au LPA. Tiré de : [427].

Enfin, d'autres GPCRs ont également été mis en évidence telle que P2y10 [445], GPR87 et CPR35 [446]. Il est à noter que l'expression et l'activation de la signalisation intracellulaire de chacun de ces récepteurs dépendent considérablement du contexte cellulaire. Ainsi, le développement des modèles de souris déficientes pour ces récepteurs et/ou l'utilisation d'antagonistes a permis d'étudier leurs rôles et leurs fonctions biologiques.

### **LPAR1**

Identifié comme le premier récepteur du LPA, le LPAR1 est largement exprimé dans plusieurs organes tels que le cerveau, le cœur, le placenta, l'intestin grêle, la rate, les reins, le côlon, les testicules, la prostate, les ovaires, le pancréas et les muscles squelettiques [447]. Son gène est localisé sur le chromosome 9 chez l'homme et le chromosome 4 chez la souris, et il code pour une protéine de 41 kDa à 7 domaines transmembranaires. La transduction du signal activé par le récepteur LPAR1 est effectuée par l'intermédiaire de 3 voies de signalisation couplée aux protéines G hétérotrimériques: G $\alpha$ <sub>q</sub>, G $\alpha$ <sub>i</sub>, et G $\alpha$ <sub>12/13</sub>. D'abord, la protéine G $\alpha$ <sub>q</sub> active la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidylinositol-biphosphate (PIP2) libérant du diacylgérol (DAG) et

l'inositol-triphosphate (IP3) qui vont agir comme seconds messagers en induisant la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et l'activation de la protéine Kinase C (PKC). Ensuite, la signalisation par la Gα<sub>12/13</sub> entraîne la contraction et la mobilité cellulaire via l'activation de la petite protéine G RhoA. De plus, l'interaction de LPAR1 avec la protéine Gα<sub>i</sub> induit l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC). LPAR1 agit également sur la protéine de survie Akt, des GTPases de type Rho et la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) [448, 352] (Figure 2-16). À cet égard, la signalisation LPAR1 entraîne une large gamme de réponses cellulaires principalement la prolifération, la survie et la migration cellulaire, ainsi que le remodelage du cytosquelette [449]. Par ailleurs, l'inactivation du gène *Lpar1* chez la souris a permis d'explorer sa fonction biologique *in vivo*. En effet, les souris *Lpar1*<sup>-/-</sup> présentent 50% de létalité périnatale. En revanche, les souris survivantes ont une taille corporelle réduite, un dimorphisme crânio-facial et un retard dans le développement cérébral [447]. Des études ont remarqué que les souris *Lpar1*<sup>-/-</sup> développent moins de fibrose rénale et pulmonaire [450]. De plus, l'inactivation du *Lpar*<sup>-</sup> chez la souris induit des troubles neurologiques similaires à la schizophrénie [451]. Ceci suggère l'importance de ce récepteur dans ces pathologies. Chez l'homme, l'expression de *LPAR1* est à la baisse lors de l'évolution du mélanome alors qu'elle augmente dans le cancer colorectal et la leucémie [452].

## **LPAR2**

D'abord, l'expression tissulaire du récepteur LPAR2 est plus limitée comparativement au LPAR1. En effet, chez la souris au stade embryonnaire, ce récepteur est très abondant dans le cerveau, mais son expression est fortement atténuée une semaine après la naissance. Ainsi, il est détecté au niveau des testicules, les reins, les poumons, le cœur, la rate, l'estomac, le thymus et le cerveau adulte. De même, chez l'homme, LPAR2 est exprimé dans les leucocytes, la prostate, les testicules, la rate, le thymus, les reins et le pancréas [447, 453]. Par ailleurs, plusieurs études démontrent que les voies de signalisations induites par le récepteur LPAR2 sont similaires à celles de LPAR1 [448, 449] (Figure 2-16). En second lieu, les souris *Lpar2*<sup>-/-</sup> naissent de façon normale et elles ne montrent aucun phénotype majeur. En effet, contrairement aux souris *Lpar1*<sup>-/-</sup>, ces animaux ne semblent pas avoir d'anomalie comportementale, anatomique ou histologique évidente [447, 453]. Par ailleurs, l'inactivation *Lpar1*<sup>-/-</sup> et *Lpar2*<sup>-/-</sup> ne montre aucune anomalie phénotypique différente de celle observée chez les animaux *Lpar1*<sup>-/-</sup> hormis une augmentation des hématomes frontaux [454, 455]. Ces données suggèrent que le récepteur LPAR1 est essentiel au développement, ce qui n'est pas le cas pour LPAR2.

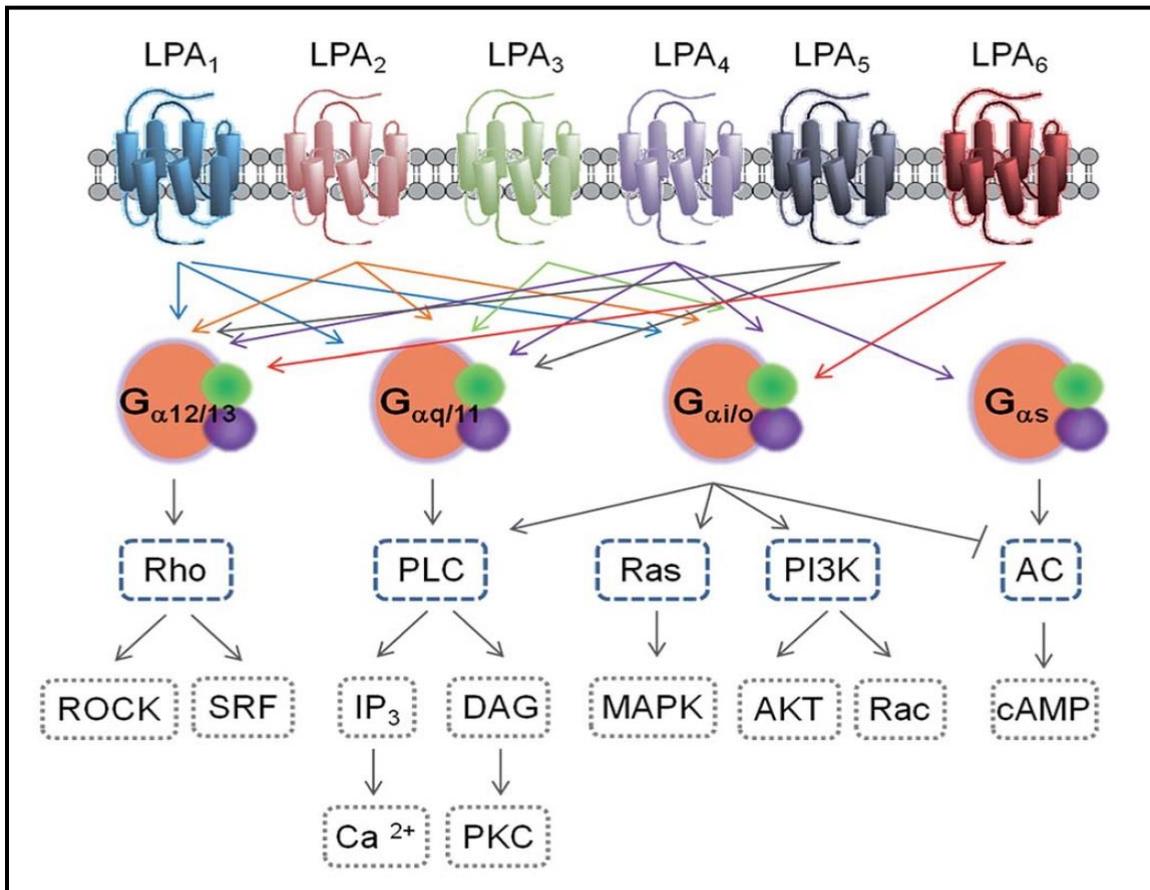
### ✚ **LPAR3**

Le gène *LPAR3* code pour un GPCR de 40 kDa et il est largement exprimé dans les testicules, les reins, les poumons et la prostate [456]. À la différence de LPAR1 et LPAR2, le LPAR3 est couplé avec les protéines  $G_{\alpha q}$  et  $G_{\alpha i/o}$  mais pas à  $G_{\alpha 12/13}$ . En effet, l'interaction de LPAR3 avec les protéines  $G_{\alpha q}$  et  $G_{\alpha i/o}$  entraîne, respectivement l'élévation du calcium intracellulaire (via l'activation du PLC) et l'inhibition de l'adénylate-cyclase [455, 457] (Figure 2-16). Il est intéressant de noter que le LPAR3 présente une affinité plus élevée pour le LPA avec des AGs insaturés. En outre, les souris *Lpar3*<sup>-/-</sup> sont viables, cependant les femelles possèdent des faibles niveaux d'ARNm *Cox-2* (cyclooxygénase-2). Cela peut causer des altérations dans leur système reproducteur, notamment un retard d'implantation embryonnaire et une hypertrophie placentaire [455]. De plus, malgré l'expression de *Lpar3* dans le cortex frontal, l'hippocampe et les amygdales, aucun phénotype lié à la perte de ce récepteur dans le système nerveux n'a été signalé à ce jour [453].

### ✚ **Les récepteurs LPAR4, 5 et 6**

Ces trois récepteurs, connus aussi sous les noms de p2y9/GPR23, GPR92 et p2y5 respectivement, appartiennent à la famille des récepteurs purinergiques P2Y.

D'abord, le récepteur **LPAR4 (GPR23)** est exprimé de façon ubiquitaire chez l'espèce humaine et chez la souris, mais il présente une expression particulièrement plus abondante dans les ovaires [458]. Chez la souris, le *Lpar4* a été détecté essentiellement dans l'utérus et le placenta. Par conséquent, ce récepteur joue un rôle important dans la reproduction et serait impliqué dans le développement du cerveau [457]. Ensuite, le **LPAR5 (GPR92)** est un récepteur qui partage 35% d'homologie de séquence d'acide aminé avec le LPAR4. Il est largement exprimé par l'intestin grêle et l'estomac chez l'Homme et la souris [453]. Les récepteurs LPAR4 et LPAR5 qui sont couplés avec les protéines  $G_{q/11}$  et  $G_{12/13}$  et activent les voies PLC et RhoA, respectivement [457, 459-460]. Enfin, le **LPAR6**, connu aussi comme un récepteur orphelin p2y5, partage une grande homologie avec le récepteur LPAR4 [447]. L'activation du LPAR6 passerait par les protéines  $G_{\alpha 12/13}$ ,  $G_{\alpha q}$  et  $G_{\alpha s}$  et entrainerait l'activation de CRE (cyclic AMP response element). LPAR6 est le seul récepteur du LPA impliqué directement dans une pathologie humaine régulant la croissance des cheveux [504]. En effet, il a été montré qu'une mutation dans le gène qui code pour LPAR6 est associée avec l'hypotrichose [504].



**Figure 2-16 :** Représentation schématique des principales voies de signalisation intracellulaires activées par les récepteurs LPA1-6. Les protéines G hétérotrimériques sont définies par leurs sous-unités  $\alpha$  en orange ; les cercles vert et violet représentent les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Adapté de : [447].

### ✚ *Autres types de récepteurs LPA*

Plus récemment, d'autres récepteurs à faible affinité pour le LPA, le GPR87 et P2Y10, ont été décrits. Ces derniers appartiennent à la famille des récepteurs purinergique P2Y et présentent des similitudes avec LPAR4 et LPAR5 [445, 447, 453]. Ce sont des GPCR orphelins qui peuvent lier soit le LPA soit la SIP [445]. Fait intéressant, le LPA peut également induire des effets biologiques en activant le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptors) [461]. En effet, l'activation de PPAR $\gamma$  par le LPA (18 :1) joue un rôle dans le remodelage vasculaire et la diminution de l'endotoxémie induite par le LPS [462]. Étant donné la difficulté de passage du LPA extracellulaire dans le compartiment intra-cellulaire, le mécanisme par lequel le LPA pourrait activer ce récepteur nucléaire reste à déterminer.

### ***2.2.2.6 Antagonistes des récepteurs LPA***

Plusieurs études ont été menées pour obtenir des agonistes et antagonistes sélectifs des récepteurs au LPA [447, 463]. En premier lieu, le **Ki16425**, un dérivé des isoxazoles, est un antagoniste des récepteurs LPAR1 et LPAR3. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que cet antagoniste bloque certains effets biologiques du LPA [460, 463, 464]. En effet, l'administration sous-cutanée de Ki16425 (20 mg/kg/jour) chez la souris diminue la formation de métastases osseuses dans le cas de cancer du sein [464]. Cet inhibiteur réduit également la fibrose rénale induite par une obstruction urétérale unilatérale. Par ailleurs, d'autres études chez la souris ont montré que le traitement avec Ki16425 en intra-péritonéal réduit l'inflammation chez des modèles expérimentaux d'obésité, de la polyarthrite rhumatoïde et la fibrose pulmonaire [465]. Deux études, dont une récente, ont montré que le blocage des Lpar1 et Lpar3 avec le Ki16425 inhibe le développement de l'athérosclérose chez des souris déficientes en récepteurs LDL et chez les souris *apoe<sup>-/-</sup>* [465, 475]. En second lieu, le **VPC12249**, un analogue du LPA, a également été décrit comme antagoniste des récepteurs LPAR1 et LPAR3 [466]. Malgré son utilisation limitée, cet inhibiteur présente certains effets bénéfiques tels que l'inhibition de la motilité de cellules cancéreuses, la diminution d'ischémie rénale et la réduction de la fibrose pulmonaire chez la souris [467]. Enfin, l'**AM095**, un autre antagoniste spécifique du récepteur LPAR1, a été utilisé pour bloquer plusieurs effets du LPA tels que l'inflammation et la fibrose pulmonaires induites par la bléomycine chez la souris [468].

### ***2.2.3 Effets physiologiques et physiopathologiques de l'axe ATX/LPA***

Le LPA intervient dans plusieurs phénomènes cellulaires, notamment la prolifération, la survie et la migration cellulaire. Étant donné la large distribution de ses récepteurs, le LPA est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques, tels que le développement du réseau vasculaire et du système nerveux [419,444,453], l'inflammation et la réponse immunitaire [378, 402], la polyarthrite rhumatoïde [403], les désordres reproductifs, la fibrose tissulaire, la cicatrisation, et le développement des maladies cardiovasculaires [378,421,444]. En outre, plusieurs études ont démontré que le LPA joue un rôle important dans la mise en place de nombreux processus cancéreux [427, 44] (Tableau 2-3).

Pathologies	Rôles pathologiques du LPA
<b>Désordres neuronaux</b>	Désordre psychiatrique Désordre bipolaire Développement
<b>Désordres neuropathiques</b>	Initiation des douleurs neuropathiques Myélination/démyélination
<b>Maladies cardiovasculaires</b>	Survie/contractibilité des myocytes cardiaques Hypertrophie Formation néointimal
<b>Désordres reproductifs</b>	Lieu et moment de l'implantation Spermatogenèse Survie des cellules germinales
<b>Cancers</b>	Invasion, migration Survie cellulaire Angiogenèse
<b>Fibroses</b>	Pulmonaire Rénale Hépatique
<b>Autres pathologies</b>	Ostéo-arthrite Diarrhée induite par le choléra Obésité

**Tableau 2-3 :** Principales rôles pathophysiologiques du LPA. Tiré de : [444].

### ***2.2.3.1 Rôle dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire***

Le LPA et l'ATX sont connus comme des inducteurs de la prolifération chez une grande variété de types cellulaires, notamment les cellules tumorales [351,353]. D'ailleurs, les cellules de mélanome A2058 se caractérisent par une forte expression de LPARs [453]. Particulièrement, LPAR1 est impliqué dans la prolifération des cellules cancéreuses mammaires et de la prostate [447]. Des études *in vitro* ont montré que l'ATX peut entraîner la migration tumorale via un mécanisme impliquant l'activation de LPAR1, et le recrutement des petites protéines G RhoA et

Rac1 [469]. De plus, l'axe ATX/LPA favorise la réendothélialisation et le maintien de l'intégrité vasculaire [402, 470]. L'ATX joue également un rôle anti-apoptotique via la voie de signalisation PI3K et AKT [471]. En outre, le LPA peut induire la survie cellulaire soit en bloquant l'activité des caspases 3/7 et la protéine proapoptotique Bad, soit en inhibant la protéine suppresseur de tumeur p53 [472]. Par ailleurs, le LPA est impliqué aussi dans la migration cellulaire. Ce phénomène est nécessaire dans le recrutement de cellules immunitaires ainsi que dans le processus d'invasion des cellules cancéreuses [378]. D'autres travaux ont démontré que le LPA peut favoriser l'invasion cellulaire via la stimulation des protéases MMPs [473]. Ces dernières jouent un rôle important dans le processus métastatique car ils permettent aux cellules tumorales de dégrader la membrane basale et d'envahir la matrice extracellulaire.

### **2.2.3.2 Rôle dans le système cardiovasculaire**

D'abord, de nombreuses études ont établi que les souris *Lpar1*<sup>-/-</sup> et *Lpar2*<sup>-/-</sup> présentent des hémorragies au niveau du cortex frontal [444,453]. Aussi, il a été décrit que les souris *Enpp2*<sup>-/-</sup> montreraient des dommages vasculaires au cours de leur stade embryonnaire [394]. Ceci suggère que l'axe ATX-LPA participe de façon importante à la formation de nouveaux vaisseaux et le maintien de la vascularisation [470].

L'agrégation plaquettaire est l'une des premières fonctions biologiques du LPA qui a été bien décrit [363,378]. En effet, suite à un défaut vasculaire ou une thrombose, les plaquettes libèrent une quantité accrue du LPA dans le sérum [378]. À son tour, le LPA relargué par les plaquettes augmente la contraction de CML des vaisseaux en modulant le calcium intracellulaire [426,470]. Par ailleurs, le LPA permet la contraction et la migration de CEs et des fibroblastes via la régulation du cytosquelette d'actine et la MEC [378]. En outre, le LPA favorise également la formation néointimal en recrutant des progéniteurs de CMLs via la chimiokine CXCL12 [474]. Il a été démontré que le LPA intervient également dans le processus d'angiogenèse. En effet, le LPA induit l'expression des gènes pro-angiogénique, notamment le VEGF (vascular endothelium growth factor) et l'IL-8 [378, 470]. En dernier lieu, le LPA joue un rôle dans les processus pathologiques du système cardiovasculaire, notamment l'athérosclérose. D'intérêt, les études précédentes ont révélé la présence du LPA dans la fraction des Ox-LDLs ainsi qu'au niveau des lésions athérosclérotiques [465]. À cet égard, l'activation des CEs par le LPA favorise l'expression des molécules d'adhérence telles que E-sélectine, V-CAM et la chimiokine CXCL1 [475]. Ces molécules favorisent l'adhésion des monocytes et participent aux processus inflammatoires et à la formation de la plaque d'athérome [426]. Aussi, le LPA est impliquée dans la différenciation de

monocyte en macrophage [426]. Par ailleurs, le LPA induit la dédifférenciation des CMLs et favorise leur migration dans l'intima des vaisseaux [462]. Ce processus entraîne l'épaississement de la néo-intima de la paroi vasculaire et la progression de l'athérosclérose. De plus, le LPA peut induire la COX-2, ce qui induit la production de prostaglandines et permet d'augmenter la perméabilité vasculaire. [426, 444]. De même, le LPA contribue aussi à la rupture de la plaque d'athérome [426, 470]. D'où, l'intérêt de développer des inhibiteurs de LPARs afin de traiter certaines maladies cardiovasculaires.

### ***2.2.3.3 Rôle dans l'obésité***

Tout d'abord, le LPA est sécrété *in vitro* par des adipocytes isolés et est retrouvé aussi dans les extraits de tissu adipeux sous-cutané [476]. Ainsi, une forte activité d'ATX a été identifiée dans les adipocytes [380]. En effet, l'ATX- $\alpha$  est l'isoforme la plus exprimée dans le tissu adipeux chez l'homme et chez la souris [375]. En outre, LPAR1 est le récepteur plus exprimé dans le tissu adipeux humain et murin. À cet égard, il a été démontré que LPAR1 induit fortement la prolifération préadipocytaire et inhibe ainsi leur maturation [426]. Par ailleurs, des études faites sur un modèle de souris obèse, souris ob/ob déficientes en récepteurs de la leptine, ont démontré que l'ATX était fortement augmentée dans le tissu adipeux [380, 477]. Il est donc clair que l'ATX pourrait moduler la différenciation de nouvelles cellules graisseuses au sein de tissu adipeux dans le cas d'obésité.

En second lieu, la régulation de l'ATX a été bien étudiée dans le tissu adipeux. En effet, chez des modèles murins il a été constaté que l'ATX est surexprimé chez les souris db/db obèses et diabétiques, alors que cette expression n'est pas augmentée chez des souris rendues obèses mais non diabétiques par un régime gras de huit semaines [380, 521]. De même, chez l'homme, l'expression de l'ATX dans le tissu adipeux est significativement augmentée chez des patientes présentant une obésité morbide associée à une intolérance au glucose [521]. Ces résultats suggèrent que l'expression de l'ATX est liée directement à la résistance à l'insuline des adipocytes et/ou à leur statut inflammatoire.

### ***2.2.3.4 LPA et les maladies neurologiques***

L'ATX est très exprimée par les plexus choroïdiens et il est retrouvé dans le cerveau. En effet, l'augmentation de la quantité du LPA dans le liquide céphalorachidien résulte d'une forte activité d'ATX. Cette activité est induite lors d'une lésion ou en cas d'un stress inflammatoire

[350]. En outre, grâce aux LPARs fortement exprimés dans le cerveau, le LPA joue un rôle important dans la neurogenèse, la survie et la migration neuronale ainsi que la myélinisation [453]. Par ailleurs, les souris déficientes en *Lpar1* présentent une démyélinisation axonale, un dysmorphisme cranio-facial et une anomalie de la succion due à des modifications de leur cortex cérébral [453-454, 470]. De plus, le LPAR1 joue un rôle majeur dans la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices neuronales [447, 453]. Aussi, l'axe ATX/LPA est impliqué dans le développement de certaines maladies neurologiques telles que les douleurs neuropathiques [451]. Ces dernières sont le résultat d'une sur-activation de LPAR1 et sa signalisation en aval, la voie RhoA. Par conséquent, LPAR1 pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement de ces douleurs. Certaines études ont démontré que les souris *Lpar1*<sup>-/-</sup> peuvent présenter également un comportement anormal qui ressemble à la schizophrénie [451]. L'axe ATX-LPA influence aussi le comportement. En effet, des études exploratoires ont démontré les souris *Lpar1*<sup>-/-</sup> présentent de lésions de grattage 'itching' [451]. Ces souris *Lpar1*<sup>-/-</sup> souffrent également d'une forte anxiété avec une mémoire réduite [478].

### ***2.2.3.5 Rôle dans le processus de la cicatrisation et la fibrose***

Premièrement, le LPA est connu comme un facteur clé impliqué dans la cicatrisation de nombreux tissus tels que l'épithélium intestinal, la cornée et le derme [479, 480]. En effet, il a été démontré que le LPA favorise la cicatrisation de blessures cutanées et l'épithélialisation intestinale [378]. Ainsi, chez le rat, une application topique de LPA augmentait l'épaisseur de la couche épithéliale néoformée et accélérât la fermeture de la plaie [426].

Deuxièmement, le LPA a été décrit comme un acteur majeur impliqué dans le processus de fibrose. De ce fait, plusieurs évidences démontrent que le LPA favorise la transdifférenciation de plusieurs types de cellules en myofibroblastes. Ces derniers sont des marqueurs déterminants du processus fibrotique. Le LPA augmente l'expression des protéines de MEC, telles que le CTGF (connective tissue growth factor). Elle peut stimuler l'assemblage de la fibronectine et l'induction des récepteurs au TGF- $\beta$  [481]. Par ailleurs, le rôle du LPA et ses récepteurs a été étudié dans un modèle murin de fibrose rénale: le modèle animal UUO (unilateral ureteral obstruction) [556, 482]. Ce modèle imite de manière accélérée le développement de la fibrose rénale, y compris l'inflammation rénale et l'activation des fibroblastes [556,557,482]. Fait intéressant, le développement de la fibrose rénale est significativement atténué chez les souris « knockout » pour le récepteur *Lpar1* (*Lpar1*<sup>-/-</sup>) [557]. Ainsi, l'effet observé chez ces souris (*Lpar1*<sup>-/-</sup>) a été confirmée

par l'utilisation de Ki16425 [464]. Ces observations démontrent clairement l'implication du LPA et de son récepteur LPA1 dans l'étiologie de la fibrose rénale.

En dernier lieu, le LPA a été retrouvé dans le liquide broncho-alvéolaire et participe de façon importante à la fibrose pulmonaire chez la souris [450]. De même, l'expression de LPAR1 est fortement augmentée chez les patients atteints de fibrose pulmonaire [483]. En outre, l'induction de la fibrose pulmonaire par la bléomycine a été inhibée chez souris « *knockout* » pour le récepteur *Lpar1* (*Lpar1*<sup>-/-</sup>) [450] ainsi que par l'utilisation des antagonistes pour LPA1-3 [450,468,484]. Enfin, l'axe ATX-LPA semblent aussi impliqué dans d'autres formes de fibrose telles que la fibrose artérielle, hépatique, dermique et rénale [481, 484-485]. Étant donné que la fibrose est un processus menant à l'altération fonctionnelle de plusieurs organes cibles, la signalisation du *Lpar1* apparait comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de diverses pathologies [485, 486].

### **2.2.3.6 Rôle dans le cancer**

Plusieurs études ont décrit le rôle de l'axe ATX/LPA dans l'induction et la progression de nombreux cancers [357]. En effet, l'ATX et le LPA agissent à tous les stades du processus cancéreux : l'initiation, la croissance tumorale, la formation et l'invasion de métastases.

Le LPA a été détecté dans les biopsies de tumeurs du côlon [472] puis dans le cas du cancer ovarien où il stimule la croissance et les métastases des tumeurs [431]. Par la suite, il a été impliqué dans le développement d'autres cancers, notamment le cancer de la prostate, du sein, de la thyroïde ou le mélanome [427]. D'autres études effectuées chez la souris ont également mis en évidence une association entre la signalisation intracellulaire induite par le LPA et la progression tumorale [357,427,484]. Par ailleurs, l'ATX est surexprimée dans de nombreuses tumeurs humaines, dont la thyroïde [387], la prostate [437], le côlon [472], le pancréas [353], le poumon, le rein, le sein, les carcinomes hépatiques ainsi que dans le lymphome d'Hodgkin [357, 419,427,484-486]. En outre, plusieurs travaux ont supporté l'idée que la surexpression du récepteur LPAR1 dans des cellules cancéreuses mammaires provoque une augmentation de la croissance tumorale et la formation de métastases osseuses. [485]

De plus, un niveau élevé de LPAR1 a également été observé dans différentes cellules de tumeurs humaines incluant les ovaires [431], la prostate [437], le poumon, le sein, l'os, l'estomac et le rein [357, 427, 484]. Ainsi, l'expression des récepteurs LPAR2 et LPAR3 est augmentée dans plusieurs formes de cancer tel que le cancer de la thyroïde, du côlon et du sein [427]. Par ailleurs, certains

travaux ont montré que le traitement des souris avec le Ki16425 réduit la formation des métastases osseuses et inhibe l'invasion des cellules tumorales pancréatiques [464, 481, 485-486]. Ces études suggèrent que l'axe ATX/LPA pourrait être considéré comme une cible pharmaceutique importante dans le développement de thérapies anti-tumorales et anti-cancéreuses.

### ***2.2.3.7 Rôle dans l'inflammation et la réponse immunitaire***

Plusieurs données émergentes indiquent que le LPA est un médiateur puissant de la réponse immunitaire [352]. Tout d'abord, les LPARs sont exprimés par plusieurs cellules immunitaires, tels que les lymphocytes T et B, les cellules NK, les mastocytes et les éosinophiles. De ce fait, plusieurs effets du LPA sur ces cellules immunitaires ont été décrits [402]. Le LPA participe à la migration, l'adhésion et l'activation des monocytes/mastocytes [378, 402]. En effet, des travaux *in vitro* ont démontré que le LPA augmente la motilité des cellules T humaines et murines [487]. Il peut également améliorer leur invasion dans des substrats tissulaires. Ainsi, des travaux indiquent que le LPA peut induire la chimiotaxie des cellules dendritiques immature et influencer leurs fonctions [402]. De plus, un niveau élevé de LPA peut entraîner une activation immunitaire inappropriée, ce qui augmente la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-2 et l'IL-6 [352, 444]. De même, l'ATX est constitutivement exprimé par les organes lymphoïdes, et joue un rôle primordial dans le processus de « homing » des cellules T [402].

Le LPA est également associée à plusieurs troubles inflammatoires et auto-immuns, y compris la sclérose systémique, l'asthme, l'allergie et l'arthrite [352,403,488]. En effet, dans un modèle murin d'asthme allergique, le blocage de l'activité ATX et/ou la déficience en *Lpar2* réduit la production des cytokines de type Th2 et l'inflammation pulmonaire [352]. Par ailleurs, des taux élevés d'ATX ont été détectés dans les synoviocytes chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [403, 489]. De même, le LPA agit comme un stimulateur de cytokines inflammatoires et favorise la migration des fibroblastes synoviaux [489]. Ainsi, chez un modèle de souris présentant une maladie articulaire inflammatoire, l'administration du Ki16425 réduit l'inflammation synoviale, ainsi que l'expression des médiateurs inflammatoires dans le tissu articulaire [402]. Enfin, des études ont révélé que l'activation de *Lpar1* et *Lpar3* chez la souris entraîne la sécrétion de plusieurs chimiokines (CXCL1) et cytokines (IL-6 et IL-10). Ces médiateurs favorisent le recrutement de leucocytes sur un site inflammatoire [490].

## **2.3 LPA et la voie inflammatoire NF- $\kappa$ B**

### ***2.3.1 La voie inflammatoire NF- $\kappa$ B***

#### ***2.3.1.1 Généralité sur NF- $\kappa$ B***

NF- $\kappa$ B (Nuclear-Factor  $\kappa$ B) est un facteur de transcription inductible et ubiquitaire. Il joue un rôle crucial dans les réponses immunitaires et inflammatoires [491-493]. De nombreuses études ont démontré que le facteur NF- $\kappa$ B régule un large spectre de gènes impliqués dans le processus antiapoptotique, la différenciation et la prolifération cellulaire [492]. Ainsi, NF- $\kappa$ B est impliqué dans la progression tumorale et la réponse à divers stress [494]. Par ailleurs, la signalisation NF- $\kappa$ B est induite par une multitude d'activateurs qui agissent via différents récepteurs. En effet, les principaux ligands et/ou les inducteurs de NF- $\kappa$ B sont : les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha/\beta$  et TRAIL, les produits bactériens et viraux tels que le LPS, la Flagelline, l'ADN ou l'ARN doubles brin [491, 494-496]. Les agents qui causent des dommages à l'ADN (radiation ou stress oxydatif) sont également connus comme des inducteurs puissants de la voie NF- $\kappa$ B. Cependant, une activation aberrante de cette voie peut conduire au développement de nombreux processus pathologiques, notamment les maladies inflammatoires et le cancer [493]. Par conséquent, il sera important d'étudier les voies d'activation et la régulation de NF- $\kappa$ B dans différents contextes cellulaires. Cela pourrait nous permettre d'identifier et de développer de nouvelles approches préventives et thérapeutiques pour plusieurs affections, tels que l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite et le cancer [491, 492].

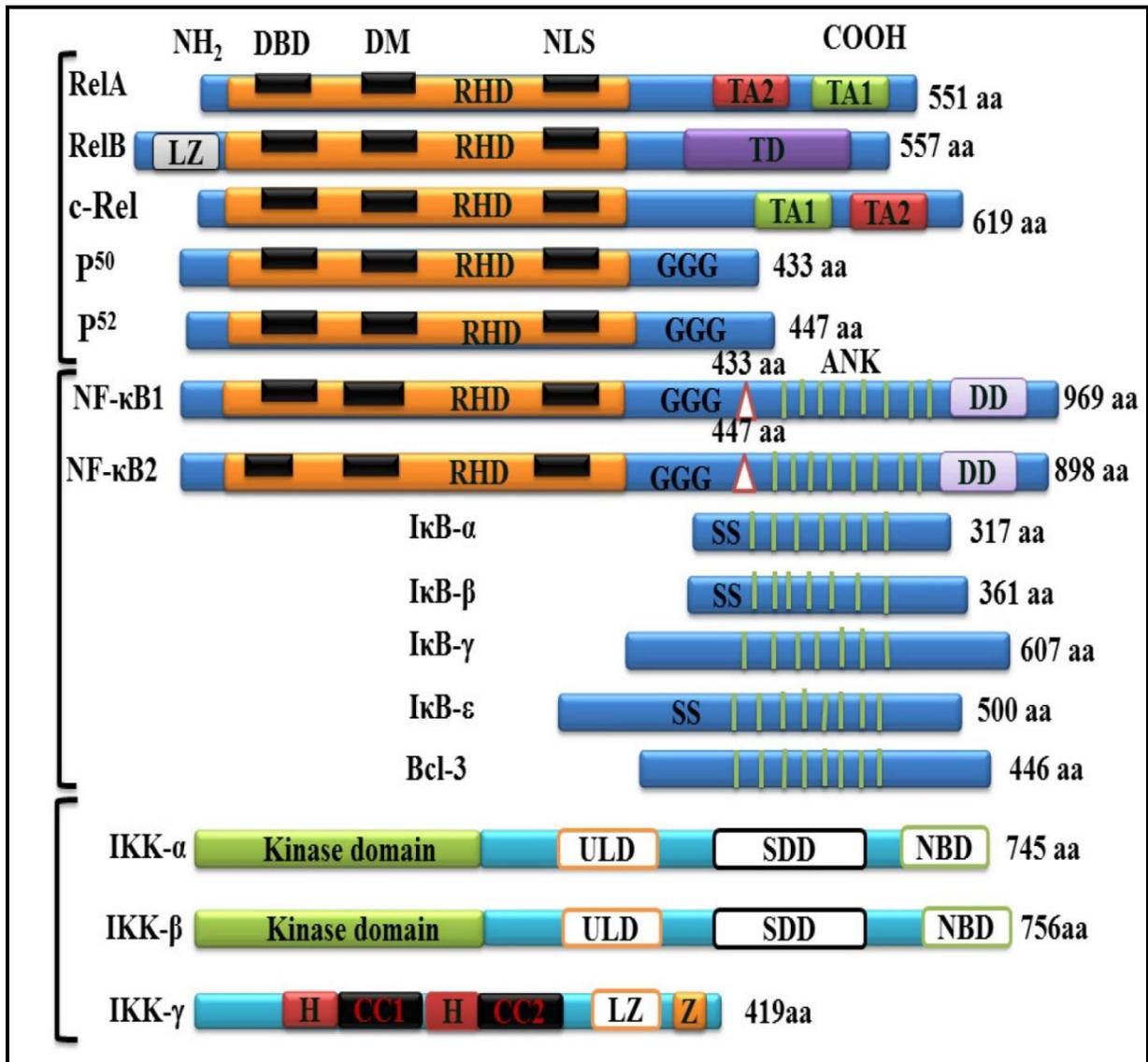
#### ***2.3.1.2 Structure des protéines NF- $\kappa$ B***

La famille de NF- $\kappa$ B se constitue de cinq sous-unités protéiques homologues: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 (NF- $\kappa$ B1) et p52 (NF- $\kappa$ B2). Ces protéines interagissent ensemble pour former des homodimères et/ou des hétérodimères; puis se lient au site kappa B de la région promotrice des gènes cibles [492, 496]. L'extrémité N-terminale de ces protéines contient un domaine d'homologie Rel appelé région RHD responsable de la liaison à l'ADN ainsi que de l'homodimérisation et hétérodimérisation. La région RHD est un domaine protéique structurellement conservé entre les espèces. Elle possède un domaine N-terminale (NTD), un domaine de dimérisation (DD), un signal de localisation nucléaire (NLS) (Figure 2-17). La partie

C-terminale permet l'interaction de l'ADN avec les protéines inhibitrices I- $\kappa$ Bs qui sont essentielles à la régulation de la signalisation NF- $\kappa$ B [497, 498].

De plus, les trois membres de la sous-famille des Rel, RelA, c-Rel et RelB, ont un domaine de transactivation TAD (C-terminal transactivation domain) qui régule l'expression des gènes [496, 497]. En revanche, NF- $\kappa$ B1/p105 et NF- $\kappa$ B2/p100 sont les précurseurs inactifs des protéines p50 et p52, respectivement [496, 497]. À l'exception de RelB, les autres monomères de la famille Rel/NF- $\kappa$ B sont capables de former 14 types d'homodimères ou d'hétérodimères au sein de la cellule. Ces dernières déterminent la spécificité intrinsèque de protéine NF- $\kappa$ B ainsi que sa régulation [491, 492].

En outre, l'activité NF- $\kappa$ B est contrôlée par une famille de protéines régulatrices nommées inhibiteurs  $\kappa$ B (I $\kappa$ Bs; I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\epsilon$ , I $\kappa$ B- $\gamma$ , Bcl-3) [492, 498] (Figure 2-17). Ces derniers sont composés de plusieurs répétitions d'un domaine ankyrine (ANK) qui leur permet d'exercer leur fonction inhibitrice. En effet, les trois membres de la famille I $\kappa$ B (I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$  et I $\kappa$ B- $\epsilon$ ) sont les seules protéines capables de se lier aux protéines Rel/NF- $\kappa$ B grâce à leurs motifs ANK. Conséquemment, ces protéines inhibitrices I $\kappa$ B masquent le domaine NLS de Rel/NF- $\kappa$ B et contribuent à leur séquestration dans le cytoplasme. Les I $\kappa$ B régulent également l'exportation des protéines NF- $\kappa$ B du noyau et ils peuvent donc entraîner une activité inhibitrice selon diverses façons [492, 497]. Par ailleurs, la dégradation d'I $\kappa$ B- $\alpha$ , qui est indispensable à l'activation du NF- $\kappa$ B, est régulée par la phosphorylation de deux sérines (32 et 36) via un complexe multiprotéique appelé IKK (I $\kappa$ B kinases). En effet, une fois phosphorylé par IKK, les inhibiteurs I $\kappa$ B- $\alpha$  sont ubiquitinylés puis dégradés par une protéolyse protéasomale. Quant au complexe IKK, il est formé par trois sous-unités différentes: deux sous-unités catalytiques IKK $\alpha$  (IKK1 ou CHUK), IKK $\beta$  (IKK2) et la sous-unité régulatrice IKK $\gamma$ . Cette dernière, encore nommée NEMO (NF- $\kappa$ B Essential Modulator), est une protéine régulatrice qui permet l'activité du complexe IKK [136, 496-498]. Enfin, l'ensemble des complexes protéiques de la signalisation NF- $\kappa$ B contrôle l'expression de différents gènes impliqués dans plusieurs réponses cellulaires [136,491]. Fait intéressant, la régulation de la voie NF- $\kappa$ B est différente selon le type et/ou le contexte cellulaire [493].



**Figure 2-17 :** Structure des familles NF-κBs, IκBs et IKK. Les domaines caractérisant chaque famille sont illustrés : RHD pour les protéines NF-κB, ANK pour les IκB et kinase/LZ/HLH pour les IKK (noter que la structure de NEMO est atypique). RHD: Rel homology domain; ANK: motif de répétition ankyrine; CC : coiled-coil; DD : death domain; HLH: helix-loop-helix; LZ: motif leucine zipper ; NBD : NEMO binding domain; PEST: domaine enrichi en proline (P), glutamate (E), sérine (S) et thréonine (T) ; TAD : transactivation domain ; ZF : Zinc-finger. Tiré de : [492].

### 2.3.1.3 Mécanisme d'activation de la voie NF- $\kappa$ B

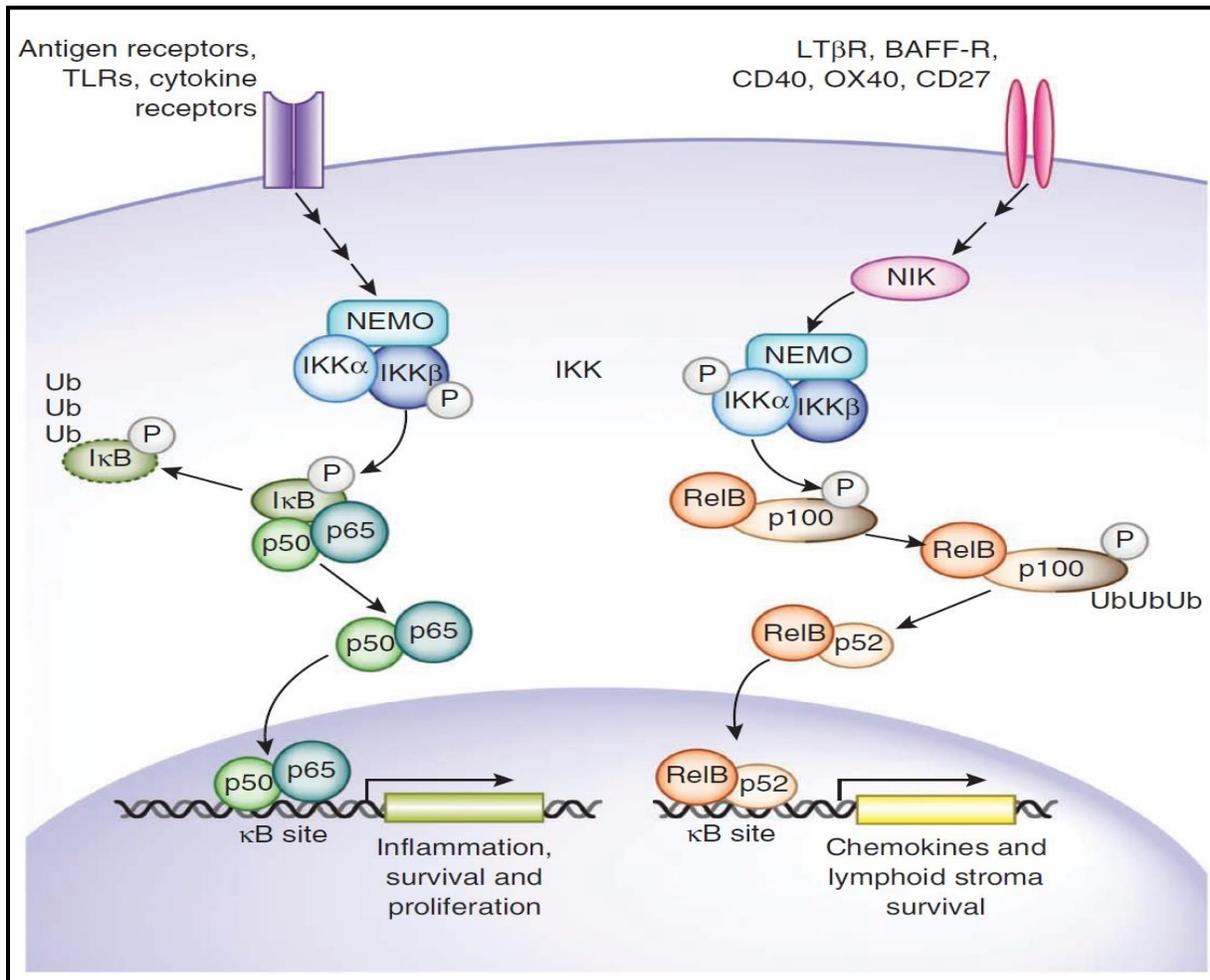
La voie NF- $\kappa$ B est divisée en deux cascades selon l'inducteur de cellules cibles: (1) la voie canonique (ou voie classique) qui est activée principalement par le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le LPS; (2) la voie non canonique (ou voie alternative) induite par la LT $\beta$ , BAFF/CD40 (Figure 2-18).

#### **La voie canonique**

À l'état normal et en absence de stimulation, l'hétérodimère RelA (p65) /p50 est maintenu inactif dans le cytoplasme grâce à ses interactions avec les protéines inhibitrices I $\kappa$ B. cependant, suite à la réception d'un signal d'activation extracellulaire, le complexe IKK sera activé par la phosphorylation des serines 117 et 181 dans les domaines catalytiques d'IKK $\beta$  [493]. À son tour, le complexe IKK phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$  sur les résidus Ser 32 et 36. Conséquemment, I $\kappa$ B est ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome. Cela conduit à la libération puis la migration de RelA(p65) /p50 vers le noyau où il contrôle l'expression d'un large spectre de gènes cibles [136, 491, 498] (Figure 2-18). D'intérêt, dans le noyau les dimères NF- $\kappa$ B se lient au site consensus  $\kappa$ B (10bp) de la région promotrice des gènes cibles de manière spécifique à un stimulus [499]. Il est important de noter que l'expression des I $\kappa$ Bs (sauf I $\kappa$ B $\beta$ ) est aussi régulée par NF- $\kappa$ B. À cet égard, lorsque ce dernier est activé, les I $\kappa$ Bs sont néosynthétisés. La protéine I $\kappa$ B $\alpha$  peut migrer dans le noyau puis compétitionner avec la sous-unité RelA/p65 pour les sites  $\kappa$ B (séquences d'ADN spécifiques). En effet, une fois dans le noyau, la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  peut décrocher le p65 fixé sur l'ADN, et dans le cas d'I $\kappa$ B $\alpha$ , retourner dans vers le cytoplasme en l'entraînant avec elle [497-498].

#### **La voie alternative (voie non-canonique)**

La voie non canonique est basée sur la phosphorylation du complexe multiprotéique IKK par une kinase en amont, nommée NIK (NF- $\kappa$ B inductible kinase) [136]. Lors de l'activation de la voie non canonique, la protéine NIK entraîne la phosphorylation de IKK $\alpha$  sur les sérines 176 et 180 [493]. Cet homodimère ainsi activé phosphoryle la sous-unité inhibitrice p100. En réponse à son ubiquitinylation préalable, la protéine p100 subit une dégradation partielle. Ceci permet la transformation de p100 en p52 qui, désassocié de l'action inhibitrice de RelB, peut migrer dans le noyau où elle régulera la transcription de gènes cibles [136, 500] (Figure 2-18).



**Figure 2-18:** La voie de transduction du signal NF- $\kappa$ B canonique et non canonique. La voie NF- $\kappa$ B canonique (à gauche) induite par des signaux comprenant des antigènes, des ligands TLR et des cytokines, telles que le TNF, utilise une grande variété d'adaptateurs de signalisation pour activer la sous-unité IKK $\beta$  du complexe IKK. La phosphorylation de IKK $\beta$  et des protéines I $\kappa$ Bs classiques liées à des dimères de NF- $\kappa$ B tels que p50-p65 entraîne une ubiquitination (Ub) de I $\kappa$ B et une dégradation induite par le protéasome. Ceci permet à NF- $\kappa$ B d'entrer dans le noyau où il se lie à des séquences d'ADN spécifiques (sites  $\kappa$ B) impliquées dans le contrôle de la transcription de gènes codant pour des diverses fonctions telles que l'inflammation, la survie cellulaire et la division cellulaire. La voie non canonique (à droite) est stimulée par les récepteurs de la superfamille des TNF-R qui induisent l'activation de NIK qui, elle, active l'homodimère IKK $\alpha$ . Ce dernier phosphoryle p100 qui est alors ubiquitinylé (Ub) puis converti en p52 via le protéasome. RelB/p52 ainsi générés se relocalisent au noyau où ils régulent l'expression de gènes-cibles, notamment les gènes impliqués dans l'organogenèse lymphoïde. Adapté de : [493].

### ***2.3.1.4 Modifications post-transcriptionnelles du NF- $\kappa$ B***

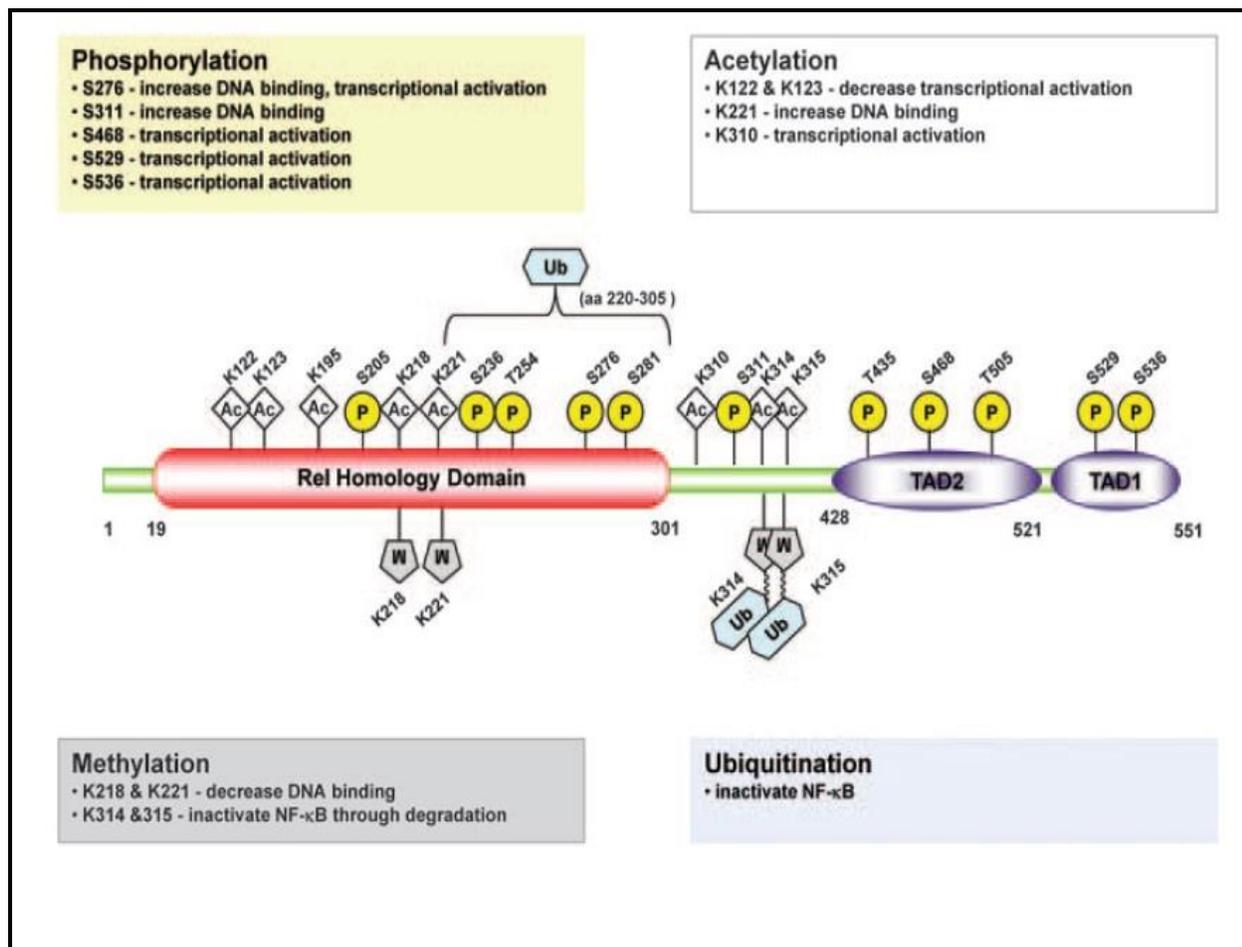
L'activité transcriptionnelle NF- $\kappa$ B peut être contrôlée par des interactions différentielles avec des co-activateurs, tels que CBP et p300 ou des protéines co-répresseurs, notamment les histones deacétylases (HDAC) [501]. Ainsi, les modifications post-traductionnelles de NF- $\kappa$ B jouent un rôle important dans le contrôle de la translocation nucléaire et la régulation de l'activité transcriptionnelle [502]. En effet, ces phénomènes modulent l'intensité, la durée d'induction et la réponse NF- $\kappa$ B. La sous-unité p65 est la protéine majeure pour laquelle ces modifications ont été bien décrites [494, 499, 503]. Cette dernière peut être modifiée directement par la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la sumoylation, la nitration de tyrosine ou la nitrosylation de cystéine [494] (Figure 2-19).

La phosphorylation et l'acétylation de p65 sont les mieux caractérisées. Jusqu'à ce jour, 13 sites de phosphorylation de p65 ciblés par des kinases ont été décrits [136,499,503]. En effet, la phosphorylation de p65 induit un changement conformationnel qui affecte l'ubiquitination, la stabilité de p65, ainsi que l'interaction protéine-protéine [503]. En outre, la phosphorylation peut améliorer ou diminuer l'activité de la transcription d'une manière spécifique d'un gène et/ou selon le contexte cellulaire. Jusqu'à présent la majorité des informations qui ont été publiées sont axées sur deux types de phosphorylations : ser536 (S536) et ser276 (S276).

#### ***✚ Signature NF- $\kappa$ B : hypothèse du code-barres***

L'activation de NF- $\kappa$ B est soumise à une régulation très complexe qui résulte de plusieurs interférences « cross-talks » entre les réseaux de signalisation cellulaires. Par conséquent, selon les stimuli et les contextes physiologiques, l'activation de NF- $\kappa$ B peut contrôler la transcription d'un large spectre de gènes différents. D'intérêt, les modifications post-traductionnelles de RelA/p65 peuvent altérer son accessibilité soit à un promoteur, à son inhibiteur I $\kappa$ B ou d'autres facteurs cellulaires. Ainsi, ces modifications peuvent moduler la stabilité et la localisation cellulaire de p65, influençant ainsi son activité transcriptionnelle au niveau des gènes cibles [524]. La théorie des codes à barres NF- $\kappa$ B émet l'hypothèse que les différents stimuli, par l'intermédiaire des réseaux de signalisation cellulaire spécifique, génèrent un type de modification post-traductionnelle unique « code à barres » sur NF- $\kappa$ B/p65. Cette signature « code - barres » permet de contrôler la transcription d'un groupe de gènes spécifique [496, 524, 543, 545]. Un exemple qui appuie cette hypothèse est la co-stimulation entre l'agent pathogène humain, *Haemophilus*

*influenzae* (NTHi) et le TGF- $\beta$  qui induit l'acétylation de RelA sur K221 et la phosphorylation S276/S536 [544]. Ces modifications activent des réponses inflammatoires dirigées contre l'infection NTHi [544]. Un autre exemple est celui de TNF- $\alpha$  qui induit la phosphorylation de RelA sur S468 et S536 qui favorisent l'expression d'un sous-ensemble de gènes spécifique [543]. Une étude récente a montré que les produits de glycation avancé ou AGE (Advanced glycation end products) augmentent l'expression du collagène I via leur récepteurs RAGE [545]. Plus précisément, cette étude démontre que la signalisation AGE-RAGE entraîne l'activation de NF- $\kappa$ B qui favorise à son tour l'expression du COL1A1 et du COL1A2. De façon intéressante, ils ont constaté que le signal AGE-RAGE induit la phosphorylation de RelA sur trois résidus spécifiques, T254, S311 et S536 [545]. Aussi, il a été démontré que l' $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  endogène avait des effets différents sur l'expression des gènes inflammatoires régulés par p65, et que la phosphorylation Ser 536 n'est pas renversée par la surexpression d' $\text{I}\kappa\text{B}$  [499]. À ce propos, une étude chez des macrophages U937 stimulés avec le LPS a montré que la phosphorylation Ser 536 de p65 est recrutée spécifiquement sur le promoteur du gène IL-8 et non sur celui d'IL-6 et TNF-  $\alpha$  [136, 499]. Ces constatations suggèrent que la régulation de la voie NF- $\kappa$ B dépend du type de stimulus et du contexte cellulaire. Enfin, le décodage de « codes à barres » NF- $\kappa$ B/p65 peut contribuer à développer des médicaments ciblant de façon spécifique la modification post-traductionnelle sur la sous-unité p65 sans affecter la réponse inflammatoire en générale. L'avantage de cette stratégie est de réduire la cytotoxicité du traitement et/ou d'éviter l'inhibition globale du facteur de transcription NF- $\kappa$ B.



**Figure 2-19 :** Les sites de modification dans la sous-unité p65 (RelA) de NF-κB. Les emplacements de divers sites de modification dans le domaine d'homologie Rel et les domaines de transactivation (TAD1 et 2) de p65 sont montrés. Les effets possibles sont indiqués dans les encadrés. Ac, l'acétylation; K, les résidus de lysine; M, méthylation; P, phosphorylation; S, résidus de sérine; Ub, ubiquitination. Tiré de : [494].

### ✚ La phosphorylation de la ser536

La phosphorylation de la sous-unité p65 en ser536 (S536) représente le site de phosphorylation le plus inductible et le plus puissant en réponse à des stimulus inflammatoires, tels que l'IL-1β, le LPS, et le TNFα, [502, 503]. Elle est fortement conservée parmi différentes espèces et joue un rôle potentiel dans la régulation de l'activité transcriptionnelle et la stabilité de NF-κB [503]. En effet, les études faites sur des cellules dans lesquelles la S536 de p65 a été substituée par l'alanine (S536A), ont démontré que S536 joue un rôle crucial dans la transcription de gènes cibles dépendante de NF-κB [501-503]. En outre, de nombreux travaux ont suggéré que la sous-unité p65 phosphorylée en ser536 n'interagit pas avec l'inhibiteur IκBα et donc ne réagit

pas à la régulation négative de ce dernier [502]. De ce fait, p65-ser536 peut se déplacer et s'accumuler dans le noyau indépendamment du contrôle négatif exercé par I $\kappa$ B $\alpha$  [499]. D'intérêt, la S536 joue également un rôle crucial dans la régulation de l'acétylation de p65 et son activité transcriptionnelle [499].

Le Ser 536 est situé dans le domaine C-terminal TAD1 et elle peut être phosphorylée par plusieurs kinases telles que, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$ , TBK1 {TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1} et RSK1 (Ribosomal Subunit 6 Kinase 1) (Table 2-4) [546-555]. La phosphorylation de ce résidu est indispensable au potentiel transactivateur de p65. D'abord, en réponse à lymphotoxine- $\beta$ , IKK $\alpha$  permet la phosphorylation de p65 sur la Ser 536 d'une manière dépendante de la kinase NIK [546]. La phosphorylation de Ser 536 se produit également en réponse à la costimulation des cellules T et peut contrôler l'importation nucléaire de p65 [547]. En plus de l'IKK $\alpha$  et de l'IKK $\beta$ , la phosphorylation Ser 536 induite par l'IL-1 peut être médiée par d'autres kinases, IKK $\epsilon$  et TBK1 [548]. Ser 536 peut également être phosphorylé par IKK $\epsilon$  dans des cellules T costimulées [549] ou dans des lignées cellulaires cancéreuses [550]. En outre, la phosphorylation de Ser 536 pourrait être déclenchée par des agents endommageant l'ADN via la kinase RSK1 [551]. De plus, la phosphorylation Ser 536 peut favoriser la déstabilisation de p65 induite par le LPS [552], ce qui suggère que la phosphorylation de p65 est utile pour de nombreuses fonctions. Par ailleurs, il a été constaté que la phosphorylation Ser 536 peut favoriser la liaison de p65 au facteur TAFII31 (TATA-binding-protein-associated factor TAFII31), un coactivateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de certains gènes cibles [548].

### ***Autres phosphorylations de p65***

Outre la phosphorylation Ser536, la Ser276 a été également caractérisée en tant qu'un site de phosphorylation important dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle du NF-K $\beta$ . Tout d'abord, Ser276 est catalysé par la protéine kinase A (PKA) et la kinase MSK1 (mitogen- and stress-activated protein kinase 1) [506]. Ainsi, il a été suggéré que les deux phosphorylations S536 et S276 déclenchent l'acétylation de p65 en lys310. Cette dernière favorise l'interaction de p65 avec ses cofacteurs CBP (CREB-binding protéine) et p300. Ces histones acétyltransférases augmentent, à leur tour, l'activité transcriptionnelle de p65 sur ces gènes cibles [503, 507]. En outre, la phosphorylation S276 a été impliquée de façon sélective dans l'expression d'un groupe de gènes régulés par NF-k $\beta$  via le recrutement de complexes kinase CDK9/Cyclin T1 (cyclin-dependent

kinase 9) à des promoteurs cibles [508]. Finalement, il est à noter qu'en plus de S536 et S276, d'autres sites de phosphorylation ont été identifiés comme régulateurs transcriptionnels. Quatre de ces sites (S205, T254, S276 et S281) se trouvent à l'extrémité N-terminal dans le domaine RHD, deux sites (S311 et S316) dans le coté terminal C de la zone de liaison au RHD et cinq sites de phosphorylation (T435, S468, T505, S529 et S536) sont situés dans le TAD C-terminal [503] (Tableau 2-4).

Site	Location	Kinase	Function	Reference
Ser 205*	RHD	unknown	Transcriptional activity	66
Ser 276	RHD	PKAc	Transcriptional activity	67, 68
		MSK1	Captivator binding Transcriptional activity	
Ser 281*	RHD	unknown	Transcriptional activity	66
Ser 311	RHD	PKC $\zeta$	Transcriptional activity	69
Ser 468	TA2	GSK3 $\beta$	Transcriptional activity	70, 71, 72
		IKK $\beta$	Transcriptional activity	
		IKK $\alpha$	Transcriptional activity	
Ser 529	TA1	CK II	Transcriptional activity	73
Ser 535	TA1	CaMKIV	Transcriptional activity	74
Ser 536	TA1	IKK $\alpha$	Transcriptional activity and stabilization	75-81
		IKK $\beta$	Transcriptional activity and nuclear import	
		IKK $\epsilon$	Transcriptional activity	
		TBK1	Nuclear localization	
		RSK1	Affinity to I $\kappa$ B $\alpha$	
Ser 547*	unknown	ATM-DSB	Transcriptional inhibition of target genes by HDAC recruitment	82
Thr 254*	RHD	unknown	Stabilization and Nuclear localization	83
Thr 435*	TA2	unknown	Transcriptional activity	84
Thr 505	TA2	ATR	Transcriptional activity	85, 86
		ChK1		
Tyr 66 Tyr 152	RHD	NO treatment	p65 dissociation from p50 and association with I $\kappa$ B $\alpha$	87

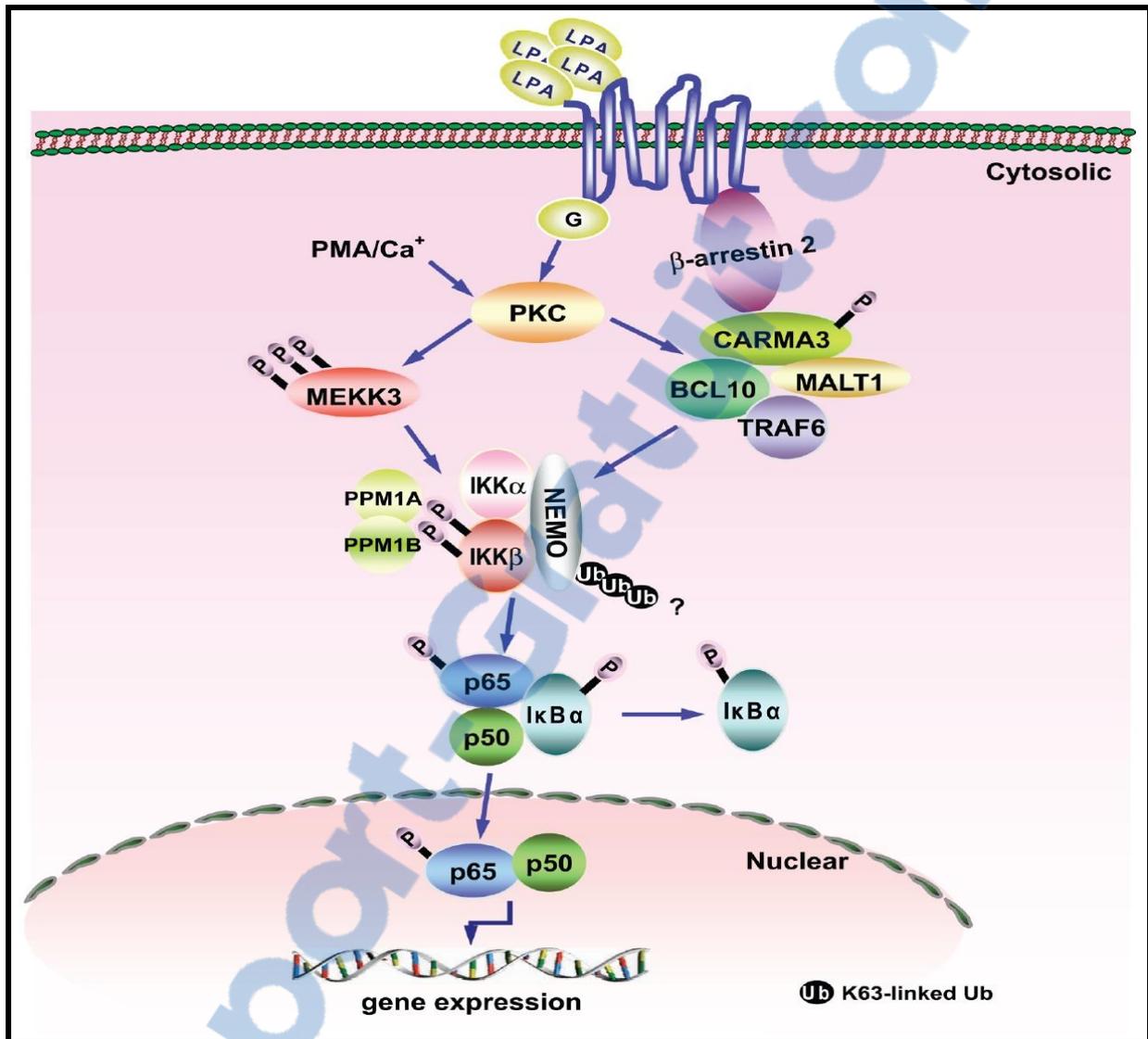
**Table 2-4 :** Les sites de phosphorylation de p65 et les kinases responsables. \*Sites de phosphorylation découverts récemment. Adapté de : [492].

### **2.3.2 Rôle de LPA dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B**

Il a été signalé à plusieurs reprises que le LPA est un inducteur puissant de l'inflammation via la voie NF- $\kappa$ B [509-512]. Ainsi, les molécules qui jouent un rôle clé dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B en réponse à la stimulation de LPA sont : la protéine PKC,  $\beta$ -arrestin 2, CARMA3 (CARD recruited membrane associated protein 3), BCL10 (B-cell lymphoma 10), MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1), TRAF6 (the tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6) et MEKK3 (MAP kinase kinase kinase 3) [512].

D'abord, suite à une induction par le LPA, les protéines d'échafaudage,  $\beta$ -arrestine 2 et CARMA3, sont recrutées aux LPARs. Conséquemment, les kinases PKC $\alpha$  et MEKK3 seront activées puis elles induisent la phosphorylation CARMA3 [509]. Cette dernière permet à son tour le recrutement des protéines de signalisation en aval, Bcl10 et MALT1. Il en résulte ainsi une formation d'un complexe multiprotéique nommé CBM (Figure 2- 20) [509]. Ce dernier entraîne l'activation du complexe IKK de la voie NF- $\kappa$ B. Plus spécifiquement, la protéine TRAF6 peut s'auto-ubiquitiner et ubiquitiner MALT1 via la formation de chaînes poly-Ub en Lys63. Cela favorise le recrutement du complexe IKK via la sous-unité IKK $\gamma$  NEMO [511]. De plus, le complexe IKK peut être phosphorylé d'une manière dépendante de la PKC. Ces deux modifications sont essentielles pour l'activité IKK kinase [509]. Ces évidences indiquent que les protéines  $\beta$ -arrestin2, Bcl10, MALT1 et CARMA3 sont des transducteurs de signal impliqués dans l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le LPA [509-512]. En deuxième lieu, certaines études ont démontré que le LPA peut activer la signalisation NF- $\kappa$ B via une protéine kinase RhoA/Rho-kinase (ROCK) [513, 514]. Cette kinase appartient à la famille de petite GTPase RhoA et son effecteur en aval, Rho kinase (ROCK) se trouve en amont des LPARs [515]. En contrôlant l'assemblage d'actine du cytosquelette et la contraction cellulaire, RhoA/ROCK régule plusieurs processus, notamment l'adhérence, la migration et la prolifération cellulaire [515]. Par ailleurs, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* qui ont utilisé des inhibiteurs de Rho kinase et LPARs ont révélé une relation entre LPAR1 et l'activation de ROCK [513]. Récemment, une étude a démontré que le récepteur LPAR1 agit à travers ROCK pour favoriser la transformation des cellules souches pluripotentes (primed PSCs) en cellules pluripotentes naïves [514]. Par ailleurs, il a été démontré que la voie RhoA/ROCK est induite par l'angiotensine II (Ang II) [522]. Ainsi, une fois activé, la protéine ROCK interagit ensuite avec d'autres protéines régulatrices, tels que le complexe NIK/MEKK14 (NF- $\kappa$ B-inducing

kinase) et conduit à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B [523, 524]. Cette activation se traduit par la phosphorylation de p65 sur la Ser536.



**Figure 2-20 :** La voie d'activation de NF- $\kappa$ B par le LPA. En réponse au LPA, les protéines  $\beta$ -arrestine 2 et CARMA3 sont recrutées au GPCR. Les kinases PKC $\alpha$  et MEKK3 sont également activées. La PKC $\alpha$  phosphoryle CARMA3 pour y induire le recrutement de BCL10 et de MALT1 ce qui forme ainsi le complexe CBM. Les phosphatases PPM1A et PPM1B se lient à l'IKK $\beta$  phosphorylé et terminent l'activation de NF- $\kappa$ B par la déphosphorylation d'IKK $\beta$  aux résidus Ser-177 et Ser-181. La phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  par IKK $\beta$  induit sa dissociation de NF- $\kappa$ B (p50/p65). Ce dernier est ainsi libéré de l'emprise de son inhibiteur et transloque au noyau afin d'induire divers gènes. Adapté de : [509].

### ***2.3.3 Implication de la voie NF-κB dans la progression du RAC***

#### ***2.3.3.1 Rôle des ROS et la voie NF-κB***

La voie NF-κB est connue pour jouer un rôle central dans l'inflammation. Ainsi, le stress oxydant est intimement lié à l'activation du NF-κB. En effet, certaines enzymes qui favorisent la production des ROS sont contrôlées par la signalisation NF-κB [492]. Étant donné que les ROS jouent un rôle important dans la progression des troubles inflammatoires, une dysrégulation ou une suractivation de la voie NF-κB peut générer des niveaux élevés de ROS. Ces derniers peuvent causer des dommages cellulaires qui aboutissent à des processus pathologiques [81, 92-93, 122]. Il a également été démontré que les ROS peuvent agir comme des cofacteurs qui favorisent la phosphorylation de NF-κB/p65 sur Ser276 via la kinase PKAc [516]. Par ailleurs, dans le contexte pathologique, certaines évidences indiquent que les ROS et la voie NF-κB jouent un rôle majeur dans le développement du RAC [81,93].

Des études ont démontré que les ROS sont produits dans les VA calcifiées et favorisent l'expression de certains gènes ostéogéniques [172]. Ce processus est dû essentiellement au découplage du NOS1 et NOS2 (Oxyde nitrique synthase 1,2) et la surexpression de NADPH synthase [81, 92]. À cet égard, un niveau élevé des ROS a été signalé au voisinage de zones calcifiées. Ces ROS participent à la génération des lipides oxydés qui induisent à leur tour une inflammation chronique dans la VA [81, 93]. De plus, une forte production de ROS mitochondriale a été signalé chez des cellules musculaires lisses aortiques bovines traitées par le β-glycérophosphate [517]. L'augmentation de ROS *in vitro* et *in vivo* favorise la calcification vasculaire via l'activation de la voie NF-κB [517]. Ainsi, il a été démontré que le stress oxydatif augmente l'activité NF-κB qui, à son tour, induit l'expression de TNFα [517]. Ce dernier favorise la calcification les cellules souches mésenchymateuses et les CMLs humains via la surexpression de Msx2. [116]. De surcroit, le TNF-α est connu comme inducteur de la voie canonique du NF-κB qui favorise la minéralisation des CIVs [116, 121-122, 136].

Par ailleurs, notre équipe de recherche a révélé une augmentation significative de la phosphorylation d'IκB (Ser32) dans les VA calcifiées humaines par rapport au VA saines [125]. De même, dans des CIVs isolées *in vitro*, nous avons démontré que la signalisation de la protéine Akt, une kinase impliquée dans la survie cellulaire, prévient l'activation de la voie NF-κB et empêche la minéralisation des cellules induite par les phosphates [125]. En outre, l'IL-6, une cible importante du NF-κB/p65 était fortement exprimée dans les VA calcifiées comparativement aux

valves saines [125]. En effet, le niveau élevé de l'IL-6 agit via un effet paracrine pour stimuler l'expression du gène pro-ostéogénique *BMP2* [125]. De plus, l'IL-6 peut stimuler les cellules ostéoblastiques pour exprimer le RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), un facteur protéique qui joue un rôle important dans l'ostéoclastogenèse [127]. Une étude récente a confirmé que la voie NF- $\kappa$ B est activée dans les VA calcifiées et est associée à une augmentation de l'expression du VEGF et du collagène [518].

Finalement, il a été démontré que NOTCH1 régule l'expression du gène *BMP2* en modulant la voie NF- $\kappa$ B chez les CIVs humaines [519]. Une autre étude a bien montré que l'axe NOTCH1-NF- $\kappa$ B est impliqué dans le contrôle de l'expression de *BMP2*, ainsi que la calcification des CIVs induite par la molécule d'adhésion ICAM-1 [520]. Pris ensemble ces études suggèrent que la voie NF- $\kappa$ B joue un rôle important dans la réponse ostéogénique et la progression du RAC.

### ***2.3.3.2 Rôle de système rénine-angiotensine (SRA)***

Le système rénine-angiotensine (SRA) joue un rôle clé dans le développement du RAC. Dans le système SRA, l'enzyme ACE (Angiotensin-converting enzyme) permet de transformer l'angiotensine I en angiotensine II (Ag II) qui joue plusieurs rôles, notamment sur la régulation de la pression artérielle. Certains travaux ont démontré que l'enzyme ACE est présente dans la VA et contribue à l'initiation et à la progression de la minéralisation [149, 150]. À cet égard, des analyses histologiques ont révélé une colocalisation entre l'Ag II, IL-6 et TNF- $\alpha$  dans les VA calcifiées [253]. En outre, l'Ang II est connu comme le principal peptide effecteur du système SRA. Ce peptide induit l'expression des gènes inflammatoires via la voie NF- $\kappa$ B [522]. En revanche, l'activation de cette voie par l'intermédiaire du récepteur AT1AR (Type 1 angiotensin receptor) est complexe et diffère de la signalisation induite par le TNF- $\alpha$  [522]. En effet, la signalisation Ang II-NF- $\kappa$ B fait intervenir les protéines adaptatrices CARMA3, Bcl10 et MALT1 [136, 523]. Ces dernières aboutissent à l'activation du complexe IKK $\gamma$ , qui, à son tour, favorise la translocation nucléaire de p65.

Par ailleurs, les études ont démontré que l'Ang II induit la phosphorylation de p65 sur Ser536 [523, 524]. L'activation p65/Ser 536 pourrait avoir des effets indésirables puisqu'elle ne peut pas être contrôlée par la protéine inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$  [501]. En effet, le *pool* nucléaire de Ser 536 se lie à la chromatine des promoteurs des gènes cibles de p65 et aboutit à une activation transcriptionnelle maintenue [501].

# **Chapitre 3 : Problématique, Objectifs et Hypothèses**

## **3.1 Problématique et objectif général**

Le RAC est une valvulopathie dégénérative caractérisée par une rigidité, un remodelage et une calcification progressive de la VA. Il s'agit donc d'une maladie complexe impliquant plusieurs processus pathologiques, notamment la rétention des lipides et leur oxydation, l'inflammation chronique, le remodelage fibrotique et la calcification de la VA. À ce jour, aucun traitement pharmacologique ne permet de prévenir ou de ralentir sa progression. À cet égard, il est important de définir le rôle de l'inflammation et des médiateurs lipidiques dans la physiopathologie du RAC. Par ailleurs, le processus moléculaire par lesquelles les lipides favorisent la minéralisation de la valve devrait être investigué pour mieux définir les facteurs impliqués dans l'initiation et le développement de la minéralisation de la VA.

L'objectif général de mon projet de doctorat est donc de définir tant sur le plan clinique que mécanistique le rôle de l'axe lipoprotéine Lp(a)-ATX, du LPA et de son récepteur LPA1 dans le développement et la progression du RAC.

## **3.2 Objectifs spécifiques**

- 1) Mon premier objectif est d'établir le lien entre l'ATX et le développement du RAC chez les patients humains.
- 2) Mon second objectif est d'étudier les liens possibles entre l'ATX et Lp(a) dans la valve aortique.
- 3) Mon troisième objectif est d'élucider le rôle de l'axe ATX-LPA dans la minéralisation des CIVs.
- 4) Mon quatrième objectif est d'étudier le ou les mécanismes d'action par lesquels le LPA et son récepteur LPAR1 favorisent l'inflammation et la réponse ostéogénique des CIVs.
- 5) Mon dernier objectif est de déterminer le rôle de l'axe ATX-LPARs dans un modèle murin de RAC. Plus particulièrement, dans ce modèle animal on testera l'effet de l'administration du Ki16425, un inhibiteur de Lpar1-3.

### **3.3 Hypothèse générale**

L'ATX est enrichi dans la fraction Lp(a)/OxPLs et transporté dans la VA. À l'intérieur de la VA, l'ATX génère du LPA, un facteur ayant des propriétés pro-inflammatoire et pro-ostéogénique. Ce dernier intervient dans la minéralisation de la VA.

### **3.4 Hypothèses spécifiques**

Nous avons émis comme hypothèses spécifiques que :

- 1) La masse et l'activité ATX pourraient interagir avec Lp(a)/OxPLs pour augmenter le risque de sténose aortique calcifiée (CAVS ou RAC) chez les patients atteints de la maladie coronarienne (MC).
- 2) L'ATX transporté par Lp(a) et secrété par les CIVs pourrait favoriser la calcification de la VA via la stimulation de la voie inflammatoire NF-kB/IL-6/BMP2.
- 3) Le LPA provenant de l'oxydation des LDLs entraîne la minéralisation de la VA via LPAR1 et la voie RhoA-p65-sérine536
- 4) L'inhibition de Lpar1 chez la souris réduit la progression du RAC.

# Chapitre 4: Article 1

## **Autotaxin interacts with lipoprotein(a) and oxidized phospholipids in predicting the risk of calcific aortic valve stenosis in patients with coronary artery disease**

**Mohamed Jalloul Nsaibia, MSc<sup>1</sup>**; Ablajan Mahmut, MD, MSc<sup>1</sup>; Marie-Chloé Boulanger, PhD<sup>1</sup>; Benoit J. Arsenault, PhD<sup>3</sup>; Rihab Bouchareb, PhD<sup>1</sup>; Serge Simard, PhD<sup>2</sup>; Joseph L. Witztum, MD<sup>5</sup>; Marie-Annick Clavel, DVM, PhD<sup>3</sup>; Philippe Pibarot, DVM, PhD<sup>3</sup>; Yohan Bossé, PhD<sup>4</sup>; Sotirios Tsimikas, MD<sup>5</sup>; Patrick Mathieu, MD, MSc<sup>1</sup>

**Journal of Internal Medicine. 2016 Nov;280(5):509-517.**

<sup>1</sup>Laboratory of Cardiovascular Pathobiology Quebec Heart and Lung Institute/Research Center, Department of Surgery, Laval University, Quebec, Canada

<sup>2</sup>Statistical consulting service unit at the Quebec Heart and Lung Institute/Research Center, Laval University, Quebec, Canada

<sup>3</sup>Department of Medicine, Laval University, Québec, Canada

<sup>4</sup>Department of Molecular Medicine, Laval University, Québec, Canada

<sup>5</sup> University of California San Diego, La Jolla, California, USA

## Résumé

### L'interaction entre l'autotaxin et les phospholipides oxydés augmente le risque de sténose aortique calcifiée chez des patients atteints de maladie la coronarienne

**Introduction:** La sténose valvulaire aortique calcifiée (CAVS) ou RAC est la maladie valvulaire la plus courante. Elle partage des facteurs de risque similaires à l'athérosclérose. Des études récentes suggèrent que la lipoprotéine(a) [Lp(a)], un transporteur majeur de phospholipides oxydés, est liée de façon causale au RAC. L'enzyme ATX joue un rôle important dans la pathogenèse du RAC. L'objectif de cette étude était d'examiner la relation entre l'activité et la masse de l'ATX circulante avec le risque de RAC.

**Méthodes :** Nous avons effectué une étude cas-témoins chez 300 patients atteints de maladie coronarienne (MC). Les patients atteints de RAC et MC (Cas, n=150) sont appariés pour l'âge et le sexe (1:1) avec les patients atteints de coronaropathie sans RAC (Contrôles, n=150). La masse et l'activité enzymatique de l'ATX, les niveaux de phospholipides oxydés (OxPL-apoB) et les niveaux de Lp(a) ont été déterminées dans le plasma des patients à jeun.

**Résultats:** Comparés aux témoins ayant seulement la MC, la masse de l'ATX ( $p < 0,0001$ ), l'activité de l'ATX ( $p = 0,05$ ), les niveaux de Lp(a) ( $p = 0,03$ ) et les niveaux de OxPL-apoB ( $p < 0,0001$ ) sont augmentés chez patients atteints du RAC. Après ajustements, nous avons montré que la masse (OR: 1,06, 95% CI 01.03-1.10 par 10 ng/ml,  $p = 0,001$ ) et l'activité ATX (OR: 1,57, 95% CI 1,14-1,61 par 10 RFU / min<sup>-1</sup>,  $p = 0,005$ ) étaient indépendamment associées au RAC. L'activité ATX interagit avec les niveaux de Lp(a) ( $p = 0,004$ ) et OxPL-apoB ( $p = 0,001$ ) pour prédire le risque du RAC. Après ajustements, comparés aux patients avec une faible activité ATX (dichotomisés à la valeur médiane) et un niveau faible de Lp(a) ( $< 50$  mg dL<sup>-1</sup>) ou de OxPL-apoB ( $< 2,02$  nmol L<sup>-1</sup>, médiane), les patients avec une forte activité ATX ( $\geq 84$  RFU min<sup>-1</sup>) et des niveaux élevés de Lp(a) ( $\geq 50$  mg dL<sup>-1</sup>) (OR 3.46, 95% CI 1.40-8.58,  $p = 0,007$ ) ou OxPL-apoB

( $\geq 2.02$  nmol L<sup>-1</sup>, médiane) (OR 5.48, 95% CI 2.45-12.27,  $p < 0.0001$ ) avaient un risque plus élevé du RAC.

**Conclusions:** Cette étude démontre que le niveau élevé de l'ATX et son activité plasmatique sont associés de façon indépendante à un risque plus élevé du RAC chez les patients avec MC. L'axe ATX-lipoprotéines pourrait être considéré comme une nouvelle cible thérapeutique.

**Mots-clés:** la sténose valvulaire aortique calcifiée, l'autotaxin, lipoprotéine(a), phospholipides oxydés.

## Abstract

**Background:** Calcific aortic valve stenosis (CAVS) is a common heart valve disorder. CAVS shares similar risk factors with atherosclerosis. Studies have shown that lipoprotein(a) [Lp(a)], an important carrier of oxidized phospholipids (OxPLs), is causally related to calcific aortic valve stenosis (CAVS). Recently, we found that autotaxin enzyme play a role in the pathogenesis of CAVS. The objectives of this study were to determine the predictive value of circulating ATX mass and activity for calcific aortic valve stenosis (CAVS).

**Methods:** We performed a case-control study in 300 patients with coronary artery disease (CAD). Patients with CAVS plus CAD (cases, n=150) were age and gender-matched (1:1) to patients with CAD without aortic valve disease (controls, n=150). Fasting plasma samples were assayed for ATX mass and enzymatic activity, Lp(a) and OxPL on apolipoprotein B-100 (OxPL-apoB).

**Results:** Compared to CAD alone, CAVS patients had elevated ATX mass ( $p < 0.0001$ ), ATX activity ( $p = 0.05$ ), Lp(a) (0.003) and OxPL-apoB ( $p < 0.0001$ ). After adjustment, we found that ATX mass (OR: 1.06, 95%CI: 1.03-1.10 per 10 ng/ml,  $p = 0.001$ ) and ATX activity (OR: 1.57, 95%CI: 1.14-2.17 per 10 RFU/min,  $p = 0.005$ ) were independently associated with CAVS. ATX activity interacted with Lp(a) ( $p = 0.004$ ) and OxPL-apoB ( $p = 0.001$ ) on CAVS risk. After adjustment, compared to patients with low ATX activity (dichotomized at median) and low Lp(a) ( $< 50$  mg/dL) or OxPL-apoB ( $< 2.02$  nM, median) levels (referent), patients with both higher ATX activity ( $\geq 84$  RFU/min) and Lp(a) ( $\geq 50$  mg/dL) (OR: 3.46, 95%CI: 1.40-8.58,  $p = 0.007$ ) or OxPL-apoB ( $\geq 2.02$  nM, median) (OR: 5.48, 95%CI: 2.45-12.27,  $p < 0.0001$ ) had an elevated risk of having CAVS.

**Conclusions:** ATX is a novel and independent predictor of CAVS in patients with CAD.

**Keywords:** Calcific aortic valve stenosis, calcific aortic valve disease, autotaxin, Lipoprotein(a), oxidized phospholipids

## Introduction

Calcific aortic valve stenosis (CAVS) is a common heart valve disorder, which is strongly associated with age [1,2]. CAVS shares some risk factors with coronary artery disease (CAD) such as diabetes, hypertension, metabolic syndrome, dyslipidemia and smoking [3-5]. The pathobiology of CAVS is akin to an athero-inflammatory process [6-8]. However, large mineral deposits in the lipid-rich area in the aortic valve leads to an obstruction of the aortic valve orifice, whereas micro-calcification in atherosclerotic blood vessels may participate in plaque rupture [9]. One important unresolved question is why some patients develop CAVS, whereas others with similar risk factors are exempt from aortic valve mineralization? This conundrum is well exemplified in patients with CAD in whom only a small percentage have concomitant CAVS [10]. Recently, Mendelian randomization studies have highlighted that the *LPA* gene, encoding for lipoprotein(a) [Lp(a)], was causally related to CAVS [11-13]. In patients with familial hypercholesterolemia, Lp(a) levels are associated with aortic valve calcification [14]. However, the process whereby Lp(a) may promote the development of CAVS remains to be determined.

We and others have previously shown that lysophosphatidylcholine (lysoPC) is present in calcified aortic valves [15,16]. The oxidation of LDL generates a high level of LysoPC [17,18]. Plasma levels of oxidized LDL are associated with the mineralization of the aortic valve [19]. On the other hand, autotaxin (ATX) is a lysophospholipase D enzyme that is secreted into the bloodstream and transforms LysoPC into lysophosphatidic acid (LysoPA) [20]. LysoPA is a bioactive lipid species that promotes inflammation, fibrosis and cell motility [21]. We recently reported that ATX is overexpressed in human explanted mineralized aortic valves and that LysoPA promoted the development of CAVS in a murine model [22]. Lp(a) is an important carrier of phosphocholine containing oxidized phospholipids (OxPL), which may serve as substrate for lipid-modifying enzymes. Circulating levels of Lp(a) and OxPL are associated with a faster progression of pre-existing CAVS [23].

In this work, we hypothesized that plasma level of ATX (mass and activity) could interact with Lp(a) and/or OxPL-apoB and predict the risk of CAVS. We performed a case-control study of patients with concomitant CAVS and coronary artery disease (CAD), which were matched with patients with CAD but no heart valve pathology. By using this strategy, we ensured that both groups had similar risk factor profiles, possibly increasing our ability to discover variable(s) specifically linked to CAVS [24].

# Methods

## Study patients

In this study, 150 patients with CAVS and CAD (at least one coronary artery stenosis  $\geq 50\%$  at angiography) and undergoing a surgery were randomly recruited. Only patients with a tricuspid aortic valve were selected in order to study a homogeneous population [24]. These patients were matched 1:1 for age ( $\pm 10$ yr) and gender with patients scheduled for a coronary artery bypass grafting who had no heart valve disease at preoperative echocardiography (normal aortic valve function and no sign of sclerosis). Patients with moderate to severe aortic and/or mitral valve regurgitation (grade  $>2$ ) were excluded. Patients with a history of rheumatic disease, endocarditis, and inflammatory diseases were excluded. The protocol was approved by the local ethical committee and written informed consent was obtained from all study participants.

## Clinical Data

Previous and current medical history included history of smoking, documented diagnoses of hypertension [patients receiving antihypertensive medications or having known but untreated hypertension (blood pressure  $\geq 140/90$  mmHg)], diabetes (fasting glucose  $\geq 7$  mmol/l or treatment with anti-diabetic medication), and detailed information on current medication was collected. Body weight, height and waist circumference were measured following standardized procedures. Blood pressure, heart rate and NYHA class were also assessed.

## Laboratory Data

Overnight fasting plasma was collected in EDTA prior to the procedure and immediately processed by the laboratory for the measurement of glucose, total cholesterol, low density-cholesterol (LDL-C), high density-cholesterol (HDL-C), and triglyceride (TG) levels. LDL-C was corrected for the cholesterol content in Lp(a) using the following formula: corrected LDL-C = LDL-C – Lp(a) mass in mg/dL  $\times 0.3$  [25]. Fasting plasma samples were also collected, stored at  $-80$  °C and used for Lp(a), OxPL-apoB and ATX measurements. Plasma Lp(a) levels were measured by turbidimetric assay using the Tina-quant Lipoprotein(a) Gen.2 system (Cobas integra 400/800, Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). OxPL-apoB was measured with chemiluminescent immunoassays as previously described [26]. ATX mass was measured in blood plasma by ELISA according to manufacturer instructions (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA) (intra-assay CV was  $< 2\%$ ). Plasma ATX activity was measured with the fluorescent-based LysoPC analogue FS3 (intra-assay CV was  $2.3\%$ ) [27]. Samples were diluted 1/6 and incubated for 15

minutes at 37°C. The reaction was initiated with the addition of FS-3 (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA) at a final concentration of 3 µM. The reaction was allowed to proceed at 37°C for 1h and the fluorescence was monitored at 520 nm.

### **Statistical Analyses**

Results are expressed as mean ± SD. Continuous data were analyzed using mixed model. The statistical models were fitted to compare heterogeneous variances among conditions (CAD and CAD+CAVS) and were tested whether the models could be reduced to a mixed model with the same variance across factor levels to verify the homogeneity of variances. The univariate normality assumption was verified with the Shapiro-Wilk test on the error distribution from the statistical model after a Cholesky factorization. If these criteria were met data were analyzed with paired t-test and otherwise data were compared with the Wilcoxon paired signed-rank test. Correlation analyses in which normality assumption and homogeneity of variances occurred were tested with Pearson coefficients and otherwise with Spearman coefficients. Categorical variables were expressed as a percentage and compared with the McNemar test. A conditional multiple logistic regression analysis was used to identify factors independently associated with CAVS. Multiple linear regression analyses were used to identify the factors that are independently associated with ATX mass and ATX activity. Variables with p values < 0.05 on univariate analysis were entered into the multivariate model (Model#1) [medication, ejection fraction, blood platelets count, coronary artery disease severity (number of diseased vessels and left main), corrected LDL-cholesterol, Lp(a), ATX mass or ATX activity]. A second model (model#2) was constructed by adding diabetes, hypertension, smoking and HDL-cholesterol to model#1. For OxPL-apoB it was introduced in model#1 and #2 in place of Lp(a). A p value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses except for conditional logistic regression and McNemar test were performed with the commercially available software package JMP 10.0 (SAS, Cary, NC, USA). Conditional logistic regression and McNemar test were performed with SPSS 23.0 (IBM, Markham, ON, Canada) and SAS 9.3 (SAS, Cary, NC, USA).

## **Results**

### **Association between autotaxin and CAVS**

Table 4.1 shows the clinical characteristics of patients with CAD and normal aortic valve (thereafter referred to as control) vs. CAD and CAVS (thereafter referred as CAVS). The mean age of patients was 71 ± 9 years with a relatively high proportion of individuals with hypertension

(73%) and diabetes (33%). Patients were matched for age and gender and did not differ with regard to clinical risk factors. In the CAVS group, there were lower proportions of patients taking calcium channel blockers (CCBs), angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) and clopidogrel. Also, there was a trend ( $p=0.05$ ) for a higher proportion of patients on angiotensin receptor blockers (ARBs) in the CAVS group. The proportion of patients treated with statins was similar in both groups ( $p=0.47$ ). In patients with CAVS, there were lower proportions of patients with 3-vessel ( $p<0.0001$ ) and left main CAD ( $p=0.01$ ). With regard to the laboratory data, CAVS patients had a higher corrected LDL-cholesterol level ( $p=0.008$ ), Lp(a) ( $p=0.003$ ), OxPL-apoB ( $p<0.0001$ ) and a lower platelet blood count ( $p=0.03$ ). The mass ( $p<0.0001$ ) and enzymatic activity of ATX ( $p=0.05$ ) were elevated in CAVS patients compared to controls.

In univariate analyses, we found that ATX mass (OR: 1.03, 95%CI: 1.02-1.04 per 10 ng/ml,  $p<0.0001$ ) was associated with CAVS. A similar trend was observed for ATX activity, but this was not statistically significant (OR: 1.10, 95%CI: 0.99-1.21 per 10 RFU/min,  $p=0.05$ ) (Table 4.2). In a multivariable model (model#1), corrected for medications (CCBs, ARBs, ACEi, clopidogrel), ejection fraction, the blood platelets count, corrected LDL-cholesterol, Lp(a) and CAD severity (1-2 or 3-vessel and left main disease), we found that ATX mass (OR: 1.06, 95%CI: 1.02-1.09 per 10 ng/ml,  $p=0.001$ ) was associated with an increased risk of CAVS (Table 4.2). Also, in the same model (model#1) ATX activity (OR: 1.45, 95%CI: 1.11-1.91 per 10 RFU/min,  $p=0.007$ ) was associated with CAVS. In a model with further adjustment (model#2) in which diabetes, hypertension, smoking and HDL-cholesterol were added into the model#1 we found that ATX mass (OR: 1.06, 95%CI: 1.03-1.10 per 10 ng/ml,  $p=0.001$ ) remained independently related with CAVS (Table 4.2). In model#2, we found that ATX activity (OR: 1.57, 95%CI: 1.14-2.17 per 10 RFU/min,  $p=0.005$ ) was also independently associated with the risk of CAVS (Table 4.2). Lp(a)  $\geq 50$  mg/dL (OR 2.06), OxPL-apoB  $\geq$ median (OR 3.36) and corrected LDL (OR: 1.01), were univariate predictors of CAVS (Table 4.2). When entered with ATX in multivariate models, Lp(a) ( $p=0.07$ ), OxPL-apoB ( $p=0.053$ ) and corrected LDL ( $p=0.52$ ) were not significantly associated with CAVS (Table 4.2). Lp(a) had a strong correlation with OxPL-apoB ( $r=0.74$ ,  $p<0.0001$ ) and thus the two variables were entered separately in multivariate models. In model #2, when ATX was not included among the covariables, elevated Lp(a) ( $\geq 50$  mg/dL as defined by the European Atherosclerosis Society)[28] (OR: 4.28, 95%CI: 1.15-15.98,  $p=0.03$ ) was significantly associated with CAVS risk. Similarly, when ATX was not entered in model#2, elevated OxPL-apoB ( $\geq 2.02$

nM, median) was significantly associated with CAVS risk (OR: 7.65, 95%CI: 2.42-24.12, p=0.002).

### **Interactions of autotaxin with Lp(a) and OxPL**

We next evaluated the relationship between ATX and Lp(a). There was a strong interaction term between ATX activity with Lp(a) (p=0.004) and OxPL-apoB (p=0.001) on CAVS. The interaction term between ATX activity and corrected LDL was not significant (p=0.18). The interaction terms between ATX mass with Lp(a) (p=0.16) and OxPL-apoB (p=0.22) on CAVS were not significant. We thus performed analyses with four groups based on ATX activity ( $\geq 84$  RFU/min, median) and Lp(a) ( $\geq 50$  mg/dL) or OxPL-apoB ( $\geq 2.02$  nM, median). After adjustment for age and gender (matched pairs), we found that when compared to patients with a low ATX activity and a low Lp(a) (referent), patients with both elevated ATX activity ( $\geq 84$  RFU/min, median) and higher Lp(a) level ( $\geq 50$  mg/dL) had a 3.5-fold increased risk of having CAVS (OR: 3.46, 95%CI: 1.40-8.58, p=0.007) (Figure 1A). Also, after adjustment for age and gender (matched pair) an elevated ATX activity ( $\geq 84$  RFU/min, median) and higher OxPL-apoB ( $\geq 2.02$  nM) was associated with a 5.5-fold risk of having CAVS (OR: 5.48, 95%CI: 2.45-12.27, p<0.0001) (Figure 1B).

### **Determinants of autotaxin mass and activity**

Age was neither related to ATX mass (r=0.09, p=0.12) nor to the activity (r=0.02, p=0.68) (Table 4.3). Women had higher ATX mass ( $732.1 \pm 263.7$  ng/ml vs.  $536.3 \pm 180.3$  ng/ml, p<0.0001) and ATX activity ( $88.5 \pm 24.0$  RFU/min vs.  $82.7 \pm 25.5$  RFU/min, p=0.02). In patients with diabetes the ATX mass was increased ( $644.2 \pm 278$  ng/ml vs.  $586.8 \pm 205.4$  ng/ml, p=0.03), whereas ATX activity was unaffected (p=0.71). Statins were neither related to the mass (p=0.22) nor to the activity of ATX (p=0.24). Table 4.3 presents the relationships between ATX and continuous variables. ATX mass was positively associated with the BMI (r=0.14, p=0.01) and OxPL-apoB (r=0.14, p=0.01). ATX mass was inversely related with the hemoglobin level (r=-0.21, p=0.0007). Obese patients (BMI $\geq 30$ ) had higher ATX mass ( $645 \pm 242$  ng/ml vs.  $588 \pm 227$  ng/ml, p=0.03) and, although not statistically significant, a higher ATX activity ( $87.5 \pm 25.6$  RFU/min vs.  $83.6 \pm 24.6$  RFU/min, p=0.11). ATX activity was modestly but significantly associated with corrected LDL-cholesterol blood level (r=0.12, p=0.04) (Table 4.3). Patients with an elevated Lp(a) level had a nonsignificant increase in ATX mass ( $629 \pm 197$  ng/ml vs.  $599 \pm 241$  ng/ml, p=0.15). In a multivariable model adjusted for age, gender, diabetes, hemoglobin and corrected LDL cholesterol, obesity (BMI $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) ( $\beta=40.5$  ng/ml, SE=14.9, p=0.006) and an elevated Lp(a) ( $\geq 50$  mg/dL) ( $\beta=33.5$  ng/ml, SE=16.6, p=0.04) were associated with higher ATX mass. When

replacing Lp(a) by OxPL-apoB we found that an elevated level of OxPL-apoB ( $\geq 2.02$  nM, median) ( $\beta=41.5$  ng/ml, SE=13.2,  $p=0.002$ ) was associated with ATX mass. Also, after adjustment, female gender ( $\beta=4.7$  RFU/min, SE=1.4,  $p=0.001$ ) and Lp(a) ( $\geq 50$  mg/dL) ( $\beta=3.1$ , SE=1.5,  $p=0.04$ ) were significantly associated with ATX activity.

## Discussion

In this work, we showed that circulating ATX is associated with CAVS in patients with CAD. After comprehensive adjustments in well-matched groups, we found that both mass and enzyme activity of ATX were independently associated with CAVS. When combined, a high ATX activity and elevated Lp(a) ( $\geq 50$  mg/dL) or elevated OxPL-apoB ( $\geq 2.02$  nM, median) increased the risk of CAVS by 3.5-fold and 5.5-fold respectively.

### *Lp(a), OxPL, autotaxin and CAVS*

We recently identified ATX as an enzyme involved in the pathobiology of CAVS [22]. First, in human explanted CAVS tissues, we found that the enzyme activity of ATX was increased while the level of LysoPA was increased by several-fold. Following a series of in-depth investigations, we showed that ATX and LysoPA were promoting inflammation and mineralization of the aortic valve through a NF- $\kappa$ B/bone morphogenetic 2 (BMP2) pathway. In a mouse model, administration of LysoPA increased the osteogenic activity in the aortic valve and accelerated the development of CAVS [22]. Moreover, we found in CAVS tissues a protein-protein interaction between ATX and apolipoprotein(a) [22]. In the present work, following a comprehensive adjustment in two different models, which accounted for confounding variables including the risk factors and lipid variables, we found that ATX mass and enzyme activity were independently associated with CAVS. Of note, Lp(a) and OxPL-apoB were significantly associated with CAVS only when ATX was not entered in the same model. We documented a statistical interaction between ATX activity and Lp(a)/OxPL-apoB on the CAVS risk. To this effect, we found a large effect size when combining elevated ATX activity with Lp(a) or OxPL-apoB levels on CAVS risk prediction. Taken together, these data suggest that ATX and Lp(a)/OxPL have important relationships with the pathophysiology of CAVS [29].

Lp(a) is an LDL particle in which apolipoprotein(a) is co-valently linked to apolipoprotein B-100. Recently, genetic association studies have underlined that Lp(a) is causally related to CAVS. However, the process whereby Lp(a) promotes the development of CAVS remains to be fully investigated. Studies have underlined that Lp(a) is an important carrier of OxPL [30] and previous

works have demonstrated that LysoPC as well as LysoPA are generated during the oxidation of LDL [18,31]. Although not yet investigated, it is possible that ATX mediates the formation of LysoPA from the LysoPC generated during the oxidation of LDL. Hence, it is possible that ATX contributes to produce LysoPA from circulating lipoproteins including Lp(a) thereby generating a pro-inflammatory condition that drives the mineralization of the aortic valve.

### ***Origin of autotaxin and role in CAVS***

ATX was first known as a motility factor involved in tumorigenesis [32,33]. ATX is a secreted glycoprotein that converts LysoPC into LysoPA, which promotes cell motility, inflammation, calcification and fibrosis. It is believed that the vast majority if not all the circulating LysoPA is derived from ATX [34,35]. Plasma ATX likely has multiple sites of origin, but adipose tissue appears to be a major source, as adipose tissue specific deletion of ATX results in a 40% reduction of circulating LysoPA levels [36,37]. In this regard, we found after appropriate adjustments, that plasma ATX mass was associated with obesity. Whether other organs/tissues than the adipose depot contribute significantly to produce circulating ATX is presently unknown. Also, following adjustments for clinical and biochemical variables we found that an elevated Lp(a) ( $\geq 50$  mg/dL) was positively associated with ATX mass and activity. The promoter of ATX contains NF- $\kappa$ B responsive elements and whether inflammatory stimuli may also enhance secretion of ATX in the context of CAVS remains to be determined [38]. Moreover, ATX is also expressed in the liver [39], although the exact contribution of the liver in the metabolism of circulating ATX has not yet been investigated.

### ***Clinical implications***

The present findings may have several clinical implications. First, this study established that ATX is associated with CAVS in patients in association with several risk factors and with concomitant CAD. Most importantly, an elevated Lp(a) or OxPL-apoB level with higher ATX enzyme activity strongly predict CAVS risk in our population. Second, the present study also shed light on potential novel mechanism by which Lp(a)/OxPL and ATX may promote the development of CAVS. Third, considering that ATX inhibitors are being evaluated in clinical trials, the present observations may have important clinical implications for the treatment of CAVS [40]. New therapies are urgently needed as surgical replacement of the aortic valve is the only therapeutic option that can be offered to symptomatic CAVS patients at the moment.

### ***Limitations***

The present work was conducted in patients with advanced CAVS plus CAD, which were referred for an aortic valve replacement and bypass surgery. Whether ATX mass or activity are also associated with mild-to-moderate aortic valve disease and the progression of CAVS remains to be investigated. Patients with CAVS and no CAD were not included in this study, therefore, whether ATX predicts CAVS and modifies the risk of Lp(a) and OxPL-apoB in these subjects remains to be determined. The present study included only patients with a tricuspid aortic valve anatomy. Patients with bicuspid aortic valves are at greatly increased risk for CAVS and whether these results can be generalized to a larger population of patients with a bicuspid anatomy remains to be established. Also, the present investigation does not necessarily support a cause-and-effect relationship between ATX and CAVS. However, considering that recent investigations have potentially found a causal relationship between Lp(a), OxPL-apoB and CAVS [11,12] and that we highlighted the molecular processes whereby ATX promotes calcification of the aortic valve [22] the present work certainly generates novel hypothesis. Taken together, these findings suggest that an ATX-lipoprotein pathway may play a significant role in CAVS.

## **Conclusions**

The present study highlighted that plasma ATX mass and activity are independently associated with CAVS. Further work is necessary in order to elucidate the role of ATX in CAVS and whether it could be considered as a potential therapeutic target.

## **Acknowledgements**

This work was supported in part by CIHR grants to P.M. MOP114893, MOP245048, MOP341860, the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Quebec Heart and Lung Institute Fund. A.M. was supported by a studentship grant from the Quebec Heart and Lung Institute Fund. Y.B. holds a Canada Research Chair in Genomics of Heart and Lung Diseases. B.J. A. and P.M. are research scholars from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS).

S.T and J.L.W were supported by HL088093, HL119828 and HL055798. We thank Xiaohong Yang at the University of California San Diego for expertly performing the OxPL-apoB analyses.

## **Disclosures**

ST and JLW are co-inventors and receive royalties from patents owned by the University of California San Diego (UCSD) for oxidation-specific antibodies. ST has a dual appointment at UCSD and as an employee of Isis Pharmaceuticals. JLW is a consultant to Isis Pharmaceuticals, Intercept, and CymaBay.

## References

- [1] Mathieu P, Boulanger MC. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease. *Can J Cardiol* 2014; 30(9): 982-93.
- [2] Mohty D, Pibarot P, Despres JP, Cartier A, Arsenault B, Picard F, Mathieu P. Age-related differences in the pathogenesis of calcific aortic stenosis: the potential role of resistin. *Int J Cardiol* 2010; 142(2): 126-32.
- [3] Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29(3): 630-4.
- [4] Eveborn GW, Schirmer H, Lunde P, Heggelund G, Hansen JB, Rasmussen K. Assessment of risk factors for developing incident aortic stenosis: the Tromso Study. *Eur J Epidemiol* 2014; 29(8): 567-75.
- [5] Capoulade R, Clavel MA, Dumesnil JG, Chan KL, Teo KK, Tam JW et al. Impact of metabolic syndrome on progression of aortic stenosis: influence of age and statin therapy. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60(3): 216-23.
- [6] Derbali H, Bosse Y, Cote N, Pibarot P, Audet A, Pepin A et al. Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2. *Am J Pathol* 2010; 176(6): 2638-45.
- [7] Bosse Y, Miqdad A, Fournier D, Pepin A, Pibarot P, Mathieu P. Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2(5): 489-98.
- [8] Mathieu P, Bouchareb R, Boulanger MC. Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease. *J Immunol Res* 2015; 2015: 851945.
- [9] Hutcheson JD, Maldonado N, Aikawa E. Small entities with large impact: microcalcifications and atherosclerotic plaque vulnerability. *Curr Opin Lipidol* 2014; 25(5): 327-32.
- [10] Hasdai D, Lev EI, Behar S, Boyko V, Danchin N, Vahanian A, Battler A. Acute coronary syndromes in patients with pre-existing moderate to severe valvular disease of the heart: lessons from the Euro-Heart Survey of acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2003; 24(7): 623-9.
- [11] Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med* 2013; 368(6): 503-12.
- [12] Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63(5): 470-7.

- [13] Arsenault BJ, Boekholdt SM, Dube MP, Rheaume E, Wareham NJ, Khaw KT et al. Lipoprotein(a) levels, genotype, and incident aortic valve stenosis: a prospective Mendelian randomization study and replication in a case-control cohort. *Circ Cardiovasc Genet* 2014; 7(3): 304-10.
- [14] Vongpromek R, Bos S, Ten Kate GJ, Yahya R, Verhoeven AJ, de Feyter PJ et al. Lipoprotein(a) levels are associated with aortic valve calcification in asymptomatic patients with familial hypercholesterolaemia. *J Intern Med* 2015; 278(2): 166-73.
- [15] Mahmut A, Boulanger MC, El HD, Fournier D, Bouchareb R, Despres JP et al. Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63(5): 460-9.
- [16] Lehti S, Kakela R, Horkko S, Kummu O, Helske-Suihko S, Kupari M et al. Modified lipoprotein-derived lipid particles accumulate in human stenotic aortic valves. *PLoS One* 2013; 8(6): e65810.
- [17] Choi J, Zhang W, Gu X, Chen X, Hong L, Laird JM, Salomon RG. Lysophosphatidylcholine is generated by spontaneous deacylation of oxidized phospholipids. *Chem Res Toxicol* 2011; 24(1): 111-8.
- [18] Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(12): 3883-7.
- [19] Cote C, Pibarot P, Despres JP, Mohty D, Cartier A, Arsenault BJ et al. Association between circulating oxidised low-density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis. *Heart* 2008; 94(9): 1175-80.
- [20] Boutin JA, Ferry G. Autotaxin. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(18): 3009-21.
- [21] Schober A, Siess W. Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases. *Br J Pharmacol* 2012; 167(3): 465-82.
- [22] Bouchareb R, Mahmut A, Nsaibia MJ, Boulanger MC, Dahou A, Lepine JL et al. Autotaxin Derived From Lipoprotein(a) and Valve Interstitial Cells Promotes Inflammation and Mineralization of the Aortic Valve. *Circulation* 2015; 132(8): 677-90.
- [23] Capoulade R, Chan KL, Yeang C, Mathieu P, Bosse Y, Dumesnil JG et al. Oxidized Phospholipids, Lipoprotein(a), and Progression of Calcific Aortic Valve Stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2015; 66(11): 1236-46.
- [24] Gaudreault N, Ducharme V, Lamontagne M, Guauque-Olarte S, Mathieu P, Pibarot P, Bosse Y. Replication of genetic association studies in aortic stenosis in adults. *Am J Cardiol* 2011; 108(9): 1305-10.
- [25] Seman LJ, Breckenridge WC. Isolation and partial characterization of apolipoprotein (a) from human lipoprotein (a). *Biochem Cell Biol* 1986; 64(10): 999-1009.

- [26] Byun YS, Lee JH, Arsenault BJ, Yang X, Bao W, DeMicco D et al. Relationship of oxidized phospholipids on apolipoprotein B-100 to cardiovascular outcomes in patients treated with intensive versus moderate atorvastatin therapy: the TNT trial. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65(13): 1286-95.
- [27] Ferguson CG, Bigman CS, Richardson RD, van Meeteren LA, Moolenaar WH, Prestwich GD. Fluorogenic phospholipid substrate to detect lysophospholipase D/autotaxin activity. *Org Lett* 2006; 8(10): 2023-6.
- [28] Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Boren J, Andreotti F, Watts GF et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* 2010; 31(23): 2844-53.
- [29] Rogers MA, Aikawa E. A Not-so-Little Role for Lp(a) in the Development of Calcific Aortic Valve Disease. *Circulation* 2015.
- [30] Bergmark C, Dewan A, Orsoni A, Merki E, Miller ER, Shin MJ et al. A novel function of lipoprotein [a] as a preferential carrier of oxidized phospholipids in human plasma. *J Lipid Res* 2008; 49(10): 2230-9.
- [31] Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C et al. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(12): 6931-6.
- [32] Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffmann E, Liotta LA. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 1992; 267(4): 2524-9.
- [33] Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(8): 582-91.
- [34] Aoki J, Inoue A, Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781(9): 513-8.
- [35] Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, Yasuda K, Fukuzawa K. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem* 2002; 277(42): 39436-42.
- [36] Dusaulcy R, Rancoule C, Gres S, Wanecq E, Colom A, Guigne C et al. Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res* 2011; 52(6): 1247-55.
- [37] Rancoule C, Dusaulcy R, Treguer K, Gres S, Attane C, Saulnier-Blache JS. Involvement of autotaxin/lysophosphatidic acid signaling in obesity and impaired glucose homeostasis. *Biochimie* 2014; 96: 140-3.

- [38] Wu JM, Xu Y, Skill NJ, Sheng H, Zhao Z, Yu M et al. Autotaxin expression and its connection with the TNF-alpha-NF-kappaB axis in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9: 71.
- [39] Giganti A, Rodriguez M, Fould B, Moulharat N, Coge F, Chomarat P et al. Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *J Biol Chem* 2008; 283(12): 7776-89.
- [40] Saga H, Ohhata A, Hayashi A, Katoh M, Maeda T, Mizuno H et al. A novel highly potent autotaxin/ENPP2 inhibitor produces prolonged decreases in plasma lysophosphatidic acid formation in vivo and regulates urethral tension. *PLoS One* 2014; 9(4): e93230.

## Tables

Variables	Total n=300	CAD n=150	CAD+CAVS n=150	P value
<b>Clinical</b>				
Age, years	71 ±9	72 ±9	71 ±9	0.86
Male gender, %	65%	65%	65%	1
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	27.7 ±4.8	27.7 ±4.5	27.6 ±5.0	0.73
Waist circumference (cm)	101 ±12	100 ±13	101 ±12	0.81
Hypertension, %	73%	71%	75%	0.34
Diabetes, %	33%	33%	32%	0.79
Obesity (BMI≥30), %	70%	71%	70%	0.89
Active smoking, %	12%	12%	12%	0.86
Peripheral vascular disease	19%	17%	22%	0.25
<b>Medication</b>				
Calcium channel blockers, %	47%	55%	39%	0.006
ACE inhibitors, %	46%	53%	39%	0.01
ARBs, %	13%	9%	17%	0.05
Statin, %	88%	88%	89%	0.47
Clopidogrel, %	14%	21%	8%	0.02
<b>Laboratory data</b>				
Glucose, mmol/L	6.02 ±1.77	5.88 ±1.73	6.16 ±1.79	0.18
LDL-cholesterol, mg/dL	91 ±34	84 ±29	99 ±38	0.001
HDL-cholesterol, mg/dL	45 ±13	44 ±14	46 ±13	0.10
Triglycerides, mg/dL	138 ±68	141 ±73	134 ±62	0.59
Lp(a), mg/dL	28.1±33.2	23.7±29.5	32.5±36.2	0.003
Lp(a)>50 mg/dL, %	21%	15%	26%	0.03
OxPL-apoB, nM	2.23±0.91	1.90±0.83	2.56±0.88	<0.0001
Corrected LDL, mg/dL	82.9	76.9	88.9	0.008
Platelet count, 10 <sup>9</sup> /L	237 ±78	248 ±86	227 ±69	0.03
Hemoglobin, g/L	128 ±17	129 ±16	127 ±18	0.35
Creatinine, µmol/L	97.2 ±28.9	96.6 ±20.5	97.9 ±35.3	0.41

ATX activity, RFU/min	84.8 ±25.0	82.1 ±25.0	87.5 ±24.7	0.05
<b>Doppler-echo and angiogram data</b>				
LVEF (%)	60±14	58±13	61±13	0.04
Peak transvalvular gradient, mm Hg	--	--	61 ±22	--
Mean transvalvular gradient, mm Hg	--	--	37 ±14	--
Aortic valve area, cm <sup>2</sup>	--	--	0.83 ±0.27	--
Indexed aortic valve area, cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup>	--	--	0.47 ±0.14	--
1-vessel disease, %	22%	6%	39%	<0.0001
2-vessel disease, %	33%	35%	30%	0.33
3-vessel disease, %	44%	57%	31%	<0.0001
Main left disease,%	13%	18%	9%	0.01

---

**Table 4-1:** Clinical characteristics of patients. **Legend:** Values are mean ± SD or %; CAD, coronary artery disease; CAVS, calcific aortic valve stenosis; BMI, body mass index; ACE, angiotensin-converting enzyme; ARB, angiotensin receptor blocker; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; Lp(a), lipoprotein(a); OxPL-apoB, oxidized phospholipids on apolipoprotein B-100; ATX, autotaxin; LVEF, left ventricular ejection fraction.

Variable	Univariable Analysis		Model#1		Model#2	
	OR (95%CI)	p value	OR (95%CI)	p value	OR (95%CI)	p value
ATX mass (per 10 ng/ml)	1.03 (1.02-1.04)	<0.0001	1.06 (1.02-1.09)	0.001	1.06 (1.03-1.10)	0.001
ATX activity (per 10 RFU/min)	1.10 (0.99-1.21)	0.05	1.45 (1.11-1.91)	0.007	1.57 (1.14-2.17)	0.005
Lp(a)≥50 mg/dL	2.06 (1.11-3.82)	0.02	2.24 (0.64-7.76)	0.20	4.19 (0.88-19.89)	0.07
OxPL-apoB≥2.02 nM (median)	3.36 (2.01-5.62)	<0.0001	1.84 (0.78-4.33)	0.16	3.37 (0.98-11.54)	0.053
Corrected LDL (per mg/dL)	1.01 (1.004-1.02)	0.004	1.01 (0.99-1.02)	0.11	1.01 (0.99-1.02)	0.52
Corrected LDL≥78.8 mg/dL (median)	1.50 (0.91-2.46)	0.11	1.91 (0.70-5.15)	0.20	1.84 (0.60-5.601)	0.28

**Table 4-2:** Univariable and multivariable analyses for CAVS. **Legend:** CAVS, calcific aortic valve stenosis; OR, odds ratio; CI, confidence interval; ATX, autotaxin; Lp(a), lipoprotein(a); OxPLapoB, oxidized phospholipids on apolipoprotein B-100; LDL, low-density lipoprotein. Model #1: medications, platelet count, corrected LDL, left ventricular ejection fraction, Lp(a), number of blood vessel (coronary artery disease) and ATX mass or activity; model #2: model #1+ diabetes, hypertension, smoking and HDL cholesterol; to determine the effect of OxPL, it was introduced in model #1-2 instead of Lp(a).

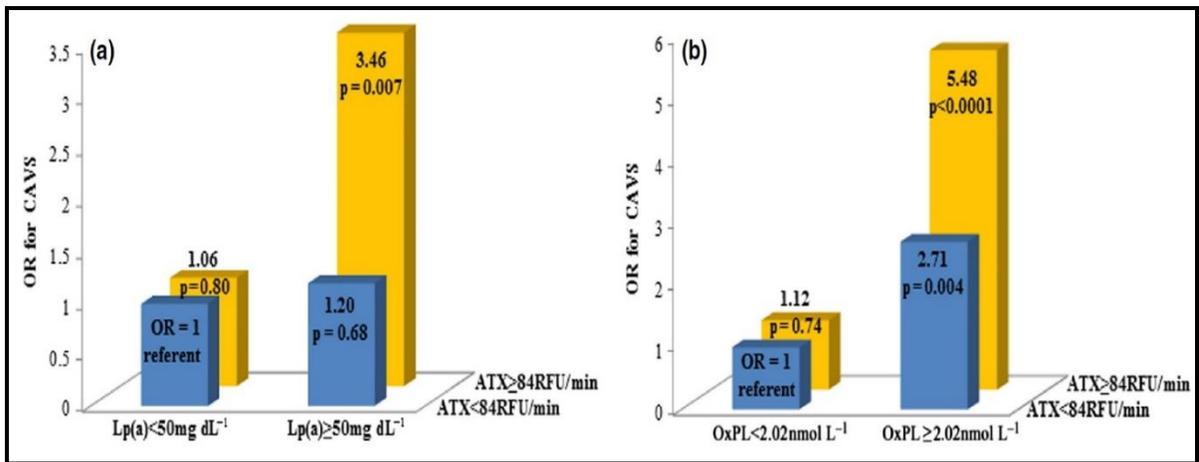
Variable	ATX mass		ATX activity	
	(ng/ml)		(RFU/min)	
	r	p value	r	p value
Age, years	0.09	0.12	0.02	0.68
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	0.14	<b>0.01</b>	0.02	0.7
Waist circumference (cm)	0.07	0.20	-0.04	0.5
Glucose, mmol/L <sup>-1</sup>	-0.09	0.1	-0.06	0.3
Corrected LDL cholesterol, mg/dL <sup>-1</sup>	0.04	0.5	0.12	<b>0.04</b>
HDL cholesterol, mg/dL <sup>-1</sup>	0.06	0.3	0.05	0.3
Triglycerides, mg/dL <sup>-1</sup>	0.07	0.3	0.08	0.2
Lp(a), mg/dL <sup>-1</sup>	0.07	0.23	0.04	0.44
OxPL-apoB, nmol L <sup>-1</sup>	0.14	<b>0.01</b>	-0.01	0.80
Platelet count, 10 <sup>9</sup> /L	-0.05	0.4	0.07	0.3
Hemoglobin, g/L <sup>-1</sup>	-0.21	<b>0.0007</b>	0.11	0.1

**Table 4-3:** Relationships between ATX and clinical and laboratory variables. **Legend:** Correlation coefficients (r) and P values (Pearson coefficient was used when normality assumption and homogeneity of variance were verified, otherwise a Spearman coefficient was calculated). In bold are significant values. ATX, autotaxin; BMI, body mass index; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; Lp(a), lipoprotein(a); OxPL-apoB, oxidized phospholipids on apolipoprotein B-100.

## Figures legends

**Figure 4-1:** Odds ratio (OR) for CAVS in patients according to ATX activity and Lp(a) (panel A) or OxPL-apoB levels (panel B). OR calculated after adjustment for age and gender (matched pair).

## Figures



# Chapitre 5: Article 2

## **Autotaxin derived from lipoprotein(a) and valve interstitial cells promotes inflammation and mineralization of the aortic valve**

**Rihab Bouchareb, PhD<sup>1\*</sup>; Ablajan Mahmut, MD, MSc<sup>1\*</sup>; Mohamed Jalloul Nsaibia, MSc<sup>1\*</sup>; Marie-Chloé Boulanger, PhD<sup>1</sup>; Abdellaziz Dahou MD<sup>2</sup>; Jamie-Lee Lépine<sup>1</sup>; Marie-Hélène Laflamme<sup>1</sup>; Fayez Hadji, MSc<sup>1</sup>; Christian Couture, MD, MSc<sup>3</sup>; Sylvain Trahan, MD<sup>3</sup>; Sylvain Pagé, MD<sup>3</sup>; Yohan Bossé, PhD<sup>4</sup>; Philippe Pibarot, PhD<sup>2</sup>; Corey A Scipione, BSc<sup>5</sup>; Rocco Romagnuolo, PhD<sup>5</sup>; Marlys L. Koschinsky, PhD<sup>5</sup>; Benoît J. Arsenault, PhD<sup>2</sup>; André Marette, PhD<sup>2</sup>; Patrick Mathieu, MD<sup>1</sup>**

**Circulation. 2015 Aug 25;132(8):677-90**

<sup>1</sup>Laboratoire d'Études Moléculaires des Valvulopathies (LEMV), Groupe de Recherche en Valvulopathies (GRV), Quebec Heart and Lung Institute/Research Center, Department of Surgery, Laval University, Quebec, Canada

<sup>2</sup>Department of Medicine, Laval University, Québec, Canada

<sup>3</sup>Department of Pathology, Laval University, Québec, Canada

<sup>4</sup>Department of Molecular Medicine, Laval University, Québec, Canada

<sup>5</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, University of Windsor, Ontario, Canada

**\* Both authors contributed equally to this work**

## Résumé

### **L'autotaxine dérivé de la lipoprotéine(a) et des cellules interstitielles valvulaires entraine la minéralisation de la valve aortique**

**Introduction :** Le rétrécissement aortique calcifié (RAC) est une maladie caractérisée par une minéralisation progressive de la valve. Des études récentes de randomisation Mendélienne ont révélé la présence d'une association entre la lipoprotéine(a) [Lp(a)] et le RAC. Cependant le mécanisme par lequel le Lp(a) entraine la calcification des cellules interstitielles de la valve aortique (CIVs) reste inconnu. Le Lp(a) transporte les phospholipides oxydés (OxPLs) avec une teneur élevée en lysophosphatidylcholine (LPC). L'enzyme autotaxine (ATX) transforme les LPC en acide lysophosphatidique (LPA). L'objectif de cette étude était: (1) d'établir la relation entre l'ATX et Lp(a) sur le développement du RAC, et (2) de déterminer le rôle de ATX-LPA dans la minéralisation des CIVs puis dans un modèle de souris.

**Méthodes :** Nous avons documenté l'expression d'ATX dans les valves contrôles et des VA calcifiées. En utilisant différentes approches *in vitro*, nous avons également investigué les mécanismes par lesquels l'ATX favorise l'inflammation et la minéralisation de la VA. Ces résultats ont ensuite été validés dans un modèle murin de RAC.

**Résultats :** L'activité enzymatique de l'ATX était plus élevée dans les VA minéralisées provenant des patients avec RAC comparativement aux tissus contrôles. De même, l'ATX était hautement exprimée dans les tissus calcifiés par rapport aux tissus contrôles. Par ailleurs, dans les VA calcifiées, le marquage immunohistochimique a révélé une surexpression d'ATX par les CIVs. Ainsi, nous avons démontré une co-localisation de l'ATX avec les phospholipides oxydés et le Lp(a). L'interaction entre ATX et Lp(a) a été confirmée par l'analyse de 'proximity ligation assay'. Nous avons détecté une forte activité d'ATX dans la fraction de Lp(a). Nous avons ensuite montré que l'axe ATX-LPA active l'inflammation et la minéralisation de la VA via la signalisation NF- $\kappa$ B/IL-6/BMP2. Chez les souris LDLR<sup>-/-</sup>/ApoB<sup>100/100</sup>/IGFII, l'ATX est surexprimée. L'injection du LPA chez ces souris favorise la minéralisation de la VA et accélère le développement du RAC.

**Conclusion :** L'ATX est transporté dans la VA par le Lp(a) et est sécrétée par les CIVs. L'ATX et le LPA favorisent l'inflammation et la minéralisation de la VA et pourrait donc représenter de nouvelles cibles thérapeutiques dans le RAC.

**Mots-clés:** Le rétrécissement aortique calcifié (RAC), la sténose valvulaire aortique calcifiée (CAVS), l'autotaxin, ENPP2, l'acide lysophosphatidique, lysophosphatidylcholine, lipoprotéine, lipoprotéine (a), les phospholipides oxydés.

Rapport-Gratuit.com

## Abstract

**Background:** Mendelian randomization studies have highlighted that lipoprotein(a) [Lp(a)] was associated with calcific aortic valve disease (CAVD). Lp(a) transports oxidized phospholipids (OxPLs) with a high content in lysophosphatidylcholine (LPC). Autotaxin (ATX) transforms LPC into lysophosphatidic acid. We hypothesized that ATX-lysophosphatidic acid could promote inflammation/mineralization of the aortic valve.

**Methods and Results:** We have documented the expression of ATX in control and mineralized aortic valves. By using different approaches, we have also investigated the role of ATX-lysophosphatidic acid on the mineralization of isolated valves interstitial cells (VICs) and in a mouse model of CAVD. Enzyme specific ATX activity was elevated by 60% in mineralized aortic valves compared to control valves. Immunohistochemistry studies showed a high level of ATX in mineralized aortic valves, which co-localized with OxPL and apolipoprotein(a). We detected a high level of ATX activity in the Lp(a) fraction in circulation. Interaction between ATX and Lp(a) was confirmed by *in situ* proximity ligation assay. Moreover, we documented that VICs also expressed ATX in CAVD. We showed that ATX-lysophosphatidic acid promotes the mineralization of the aortic valve through a NF- $\kappa$ B/IL-6/BMP2 pathway. In LDLR<sup>-/-</sup>/ApoB<sup>100/100</sup>/IGFII mice, ATX is overexpressed and lysophosphatidic acid promotes a strong deposition of hydroxyapatite of calcium in aortic valve leaflets and accelerates the development of CAVD.

**Conclusion:** ATX is transported in the aortic valve by Lp(a) and is also secreted by VICs. ATX-lysophosphatidic acid promotes inflammation and mineralization of the aortic valve and thus could represent novel therapeutic targets in CAVD.

**Keywords:** Calcific aortic valve disease, calcific aortic stenosis, aortic stenosis, lysophosphatidic acid, lysophosphatidylcholine, autotaxin, ENPP2, Lp-PLA2, oxidized-LDL, oxidized phospholipids, Lp(a), apolipoprotein (a)

## Introduction

Mineralization of the aortic valve is the major culprit involved in the development of calcific aortic valve disease (CAVD) [1]. There is, so far, no medical treatment for CAVD [2]. The main process that triggers pathologic mineralization of the aortic valve remains elusive [3]. Recently, three successive studies with a Mendelian randomization design have reported a significant association between the *LPA* gene variant (rs10455872), which genetically determines the lipoprotein(a) [Lp(a)] plasma level, and CAVD [4-6]. These studies thus suggested a causal relationship between Lp(a) and CAVD risk. Lp(a) is a LDL-like particle in which an apolipoprotein(a) is linked by a disulphide bridge to apolipoprotein B. Lp(a) is a major carrier of oxidized phospholipids (OxPLs) and has been associated with atherosclerosis [7]. However, the mechanism(s) by which Lp(a) could promote the mineralization of the aortic valve is still unresolved. Mahmut et al. showed that lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) is highly expressed in mineralized aortic valve and is related to several indices of tissue remodelling [8]. Lp-PLA2 uses OxPLs, which are incidentally transported by Lp(a), as substrate and produces lysophosphatidylcholine (LPC) [9]. Also, through non-enzymatic pathways, the oxidation of low-density lipoproteins (LDL) generates LPC [10-11], a highly reactive metabolite with pro-osteogenic properties and present in mineralized aortic valves [8,12].

Autotaxin (ATX), encoded by the *ENPP2* gene, is a lysophospholipase D enzyme that is transported in the blood plasma and secreted by different cell populations [13]. ATX uses LPC as a substrate and produces lysophosphatidic acid, which has potent pro-inflammatory properties [14]. The expression and role of ATX in CAVD has never been explored. In this work, we hypothesized that ATX may play an important role in mediating inflammation and mineralization of the aortic valve.

## Methods

### *Procurement of tissues for analyses*

We examined stenotic aortic valves (CAVD) that were explanted from patients at the time of aortic valve replacement. The protocol was approved by the local ethical committee and informed consent was obtained from the subjects.

### ***VICs isolation***

Human VICs were isolated from control non-mineralized aortic valves obtained from patients undergoing heart transplantation.

### ***ATX activity***

Control non-mineralized and CAVD valve tissues were homogenized. The reaction was initiated with the addition of FS-3 (Echelon Biosciences, UT, USA) at a final concentration of 3  $\mu$ M. The reaction was allowed to proceed at 37°C for 1h and the fluorescence was monitored at 520 nm.

### ***Western blotting***

Tissue pieces were mixed with lysis buffer. Membranes were blocked with TBS-tween containing 5% non-fat dry milk, incubated with ATX (Fisher ThermoScience, QC, Canada) and  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich, ON, Canada) antibodies overnight at 4°C. Membranes were then washed and incubated with HRP-labeled secondary antibodies (Cell Signaling Technology, MA, USA).

### ***Quantification of lysophosphatidylcholine and lysophosphatidic acid by thin layer chromatography***

Aortic valve was homogenized for 30 seconds in 3mL  $\text{CHCl}_3$ : $\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1) containing 1% butylated hydroxytoluene. Samples were first migrated in  $\text{CHCl}_3$ : $\text{CH}_3\text{OH}$ : $\text{H}_2\text{O}$  (65:24:4) and then in hexane: diethyl ether:acetic acid (75:35:1). Visualization was performed using 0.1% Amido Black 10b in 1M NaCl.

### ***Immunostaining analyses***

Immunostaining analyses were performed with the following antibodies: ATX (Fisher ThermoScience, QC, Canada), ox-LDL (Accurate chemical, ON, Canada), E06 (Avanti Polar Lipids, AL, USA), Lp(a) (Novus Biologicals, ON, Canada) and Lp-PLA2 (Abgent, CA, USA). Slides were incubated with primary antibodies overnight at 4°C in 1% BSA in TBS1X and then washed with TBS1X. The EnVision Dual Link System-HRP and the AEC substrate (Dako, CA, USA) were used to detect signal.

### ***Proximity ligation assay***

Six  $\mu\text{m}$  slices were cut from OCT embedded human mineralized aortic valve leaflets. Following permeabilization, the proximity ligation assay (Olink Bioscience, Sweden) was performed according to the manufacturer's instructions using monoclonal antibody 4H1 (Fisher ThermoScience, QC, Canada) that recognizes apolipoprotein (a) (fragment 4330-4521) and polyclonal antibody against ATX (Fisher ThermoScience, QC, Canada).

### ***Real-time PCR***

RNA was extracted from valves explanted from patients, mice and from cells during *in vitro* experiments. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed with Quantitec SYBR Green PCR kit from Qiagen on the Rotor-Gene 6000 system (Corbett Robotics Inc, CA, USA).

### ***In vitro analyses of calcification***

Cells were incubated for 7 days with a pro-calcifying medium containing: DMEM + 5% FBS,  $10^{-7}$  M insulin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ascorbic acid and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  at 2 mM.

### ***Quantification of IKK $\alpha$ and pIKK $\alpha$***

VICs were collected in cell lysis buffer. CAVD tissues were homogenized in lysis buffer. Lysates were used directly in ELISA kit (PathScan®IKK $\alpha$ /Phospho-IKK $\alpha$  (Ser176/180), Cell Signaling Technology, Inc., USA). The quantification of IKK $\alpha$  and phospho-IKK $\alpha$  was determined in accordance with the manufacturer's instructions and normalized with protein content.

### ***Measurement of IL-6 and ATX in supernatants***

IL-6 was measured in supernatants of human VICs exposed to lysophosphatidylcholine, Ki6425 or lysophosphatidic acid for 48 hours. IL-6 was measured by ELISA (R&D Systems, MN, USA) according to manufacturer's instructions.

ATX was measured in supernatants of human VICs using ELISA (Echelon Biosciences, UT, USA) according to manufacturer's instructions and normalized with protein content.

### ***Animals***

All animal protocols were conducted according to guidelines set out by the Laval University Animal Care and Handling Committee and are conform with the NIH guidelines

for the care and use of laboratory animals. LDLR<sup>-/-</sup> /ApoB<sup>100/100</sup> /IGF2 (on C57Bl/6J background) were generated from an established colony at the Heart and Lung Institute. C57BL/6 mice were purchased from Jackson Laboratories (MA, USA). Male mice were fed *ad libitum* a high fat, high sucrose, cholesterol diet (55% calories from fat, 28% from sucrose, 0.2% cholesterol) for 6 months starting at 12 weeks of age.

### ***Echocardiography in mice***

The investigator performing echocardiography analyses was blinded to the group allocation. Transthoracic echocardiography was performed under 2.5%-isoflurane anaesthesia, with a L15-7io (5-12 Megahertz) and S12-4 (4-12 Megahertz) probes connected to a Philips HD11XE ultrasound system (Philips Healthcare Ultrasound, Netherlands).

### ***Statistical analyses***

Results were expressed as means  $\pm$ SEM. Continuous data were tested for normality of distribution with the Shapiro-Wilk test and compared with Student t-test. For continuous data with a non-normal distribution or with a  $n \leq 10$  the values were compared between groups with nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test when two or more than two groups were compared respectively. Post-hoc Steel-Dwass multiple comparisons test were performed when the p value of the Kruskal-Wallis test was  $<0.05$ . Categorical data were expressed as a percentage and compared with Fisher exact test. A p value  $<0.05$  was considered as statistically significant. Statistical analyses except for the Wilcoxon-Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were performed with commercially available software package JMP 10.0. Wilcoxon-Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were performed with Prism 6.0.

## **Results**

### ***Expression of autotaxin in calcific aortic valve disease***

We measured the ATX enzyme specific lysophospholipase activity in 47 aortic valves from both control (n=12) and CAVD (n=35) (Table 5.1) by using the FS-3 substrate, a fluorogenic analogue of LPC. We documented that ATX activity was increased by 60% in mineralized aortic valves when compared to control non-mineralized aortic valves (Figure 1a). The increase in ATX activity in mineralized aortic valves was similar in tricuspid

(56%) and bicuspid valves (68%) (Figure 1b). Considering the age difference between the groups, in subanalysis we next matched for age and gender the 12 controls with CAVD (n=12) (Table 5.2). In valves that were age- and gender-matched, we found that ATX activity was increased by 49% in stenotic aortic valves when compared to control non-mineralized valves (Figure 1c). To further confirm these results, we documented the expression of ATX in 12 controls and 15 stenotic aortic valves by western blotting. We found that protein level of ATX was increased by 2.7-fold in mineralized aortic valves (Figure 1d). Considering that ATX produces lysophosphatidic acid from LPC we next measured by thin layer chromatography the levels of lysophospholipids in control and mineralized stenotic aortic valves. This analysis indicated that lysophosphatidic acid was increased by 1.5-fold in stenotic aortic valves when compared to control non-mineralized tissues (Figure 1e and f). In stenotic aortic valves, the level of lysophosphatidic acid surpassed LPC by 11.9-fold (Figure 1g). Hence, these data suggest that a high level of ATX activity in mineralized aortic valve is associated with the production of lysophosphatidic acid.

#### ***Autotaxin is transported by Lp(a) in the aortic valve***

By using immunohistochemistry studies (control n=15 and CAVD n=15) we found that ATX staining was weak in control non-mineralized aortic valves (Figure 2a). However, ATX was highly expressed in mineralized aortic valves and appears as a diffuse and a cellular staining, suggesting that it is secreted and also possibly transported in the aortic valve (Figure 2a and b). We next immunostained aortic valves for lipoproteins and determined on adjacent sections the co-localization with ATX. By using an antibody reacting with malondialdehyde-modified oxidized-LDL (ox-LDL), we documented that the staining in stenotic aortic valves was intense and localized in the fibrosa layer often in the vicinity of mineralized nodules where ATX was expressed (Figure 2b). We next used the EO6 antibody, which reacts against OxPLs and we documented that it co-distributed with ox-LDL and ATX stainings (Figure 2b). As a large fraction of OxPLs are transported by Lp(a) in circulation, we next stained aortic valve sections with an antibody against Lp(a). The immunostaining for Lp(a) co-distributed with ox-LDL, OxPL and ATX (Figure 2b). Finally, on adjacent sections we also documented that OxPL, Lp(a) and ATX co-localized with Lp-PLA2 (Figure 2b). In confocal immunofluorescence studies, ATX co-

localized with Lp(a) (Figure 2c). Taken together, these data raised the hypothesis that ATX is transported by lipoproteins in the aortic valve. To examine this possibility, we measured in healthy volunteers the ATX enzyme activity in isolated Lp(a) fractions. In isolated Lp(a) fraction, ATX enzyme activity was increased by 4.6-fold when compared to the blood plasma (Figure 2d). These data further supported the hypothesis that ATX is transported in the bloodstream by lipids and enriched in the Lp(a) fraction. To further substantiate this finding, we next used *in situ* proximity ligation assay, which allows the detection of protein-protein interactions in tissue sections (Figure 2e). We used the monoclonal antibody 4H1 that recognizes the apolipoprotein (a) (fragment 4330-4521) and a polyclonal antibody against ATX. By using proximity ligation assay in mineralized aortic valves, we found that ATX was forming a complex with apolipoprotein(a) (each red dot represents apolipoprotein(a) and ATX interaction) (Figure 2f). Taken together, these findings suggest that ATX is possibly transported in the aortic valve by Lp(a).

#### ***Autotaxin is expressed by VICs: relationships with remodelling and inflammation***

We next hypothesized that in addition of being transported by lipoproteins, ATX could also be produced and secreted by VICs. By using confocal microscopy, we documented in stenotic aortic valves that ATX positive cells co-expressed vimentin, a marker expressed by VICs (Figure 3a). Human VICs were isolated from non-mineralized aortic valves obtained during heart transplantation and we determined in isolated cells the expression of ATX by using immunofluorescence. We found that isolated VICs also widely expressed ATX, which is located in the cytosol and enriched in the perinuclear region (Figure 3b). We next measured the mRNA levels of ATX in 67 stenotic aortic valves (Table 5.3) and compared its expression with the remodelling score. In valves with a higher level of mRNA encoding for ATX ( $\geq 13.2$  copies/HPRT, median) there was a higher remodelling score (Figure 3c). The expression of ATX was associated with the expression of IL-6 (Figure 3d) and indices of inflammation (Supplementary Figure 1). To confirm that the NF- $\kappa$ B pathway is activated in CAVD and related to ATX, we next measured in 10 mineralized aortic valves the phosphorylated IKK $\alpha$  (Ser 176-180)/IKK $\alpha$  ratio, which is upstream in the NF- $\kappa$ B pathway. In valves with an elevated ATX mRNA level the total amount of IKK $\alpha$  was not modified (Figure 3e), whereas the phosphorylated IKK $\alpha$  (Ser 176-180)/IKK $\alpha$  ratio

was increased by 1.7-fold (Figure 3f). These findings confirmed that ATX is related to tissue remodelling and the activation of the NF- $\kappa$ B pathway in CAVD.

***Lysophosphatidylcholine stimulates the NF- $\kappa$ B pathway in VICs: role for mineralization***

Lp-PLA2, which is highly expressed in mineralized aortic valves and co-localizes with ATX, uses ox-LDL to produce the highly reactive LPC. Moreover, the oxidation of LDL leads to the production of LPC, which is incidentally present in human mineralized aortic valves. In turn, LPC is the natural substrate of ATX. We first assessed the role of LPC on the activation of inflammatory pathway. Immunofluorescence studies in isolated VICs demonstrate a nuclear translocation of the p65 subunit of NF- $\kappa$ B in response to LPC, indicating that the inflammatory pathway is activated. In control non-treated VICs, we observed that p65 is mostly localized in the cytosol (Figure 4a). However, in VICs exposed to low concentration of LPC (100 nM) (blood plasma levels  $\sim$ 200 $\mu$ M) [15] the p65 subunit is progressively translocated to nucleus in 30 minutes, indicating activation of the NF- $\kappa$ B pathway (Figure 4a). We previously showed that activation of NF- $\kappa$ B pathway in VICs promotes the production of IL-6, which by a paracrine effect mediates the mineralization of cell cultures through the production of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) [16]. We thus measured by ELISA the levels of IL-6 in supernatants of VICs. In isolated VICs, we found that a 24 hours exposure to LPC (100nM) increased the secretion of IL-6 by 3.5-fold (Figure 4b). VICs were next treated for 7 days with the mineralizing medium with or without LPC (100 nM) and the levels of mineralization were measured. We documented that BAY11-7085 (an inhibitor of I $\kappa$ B phosphorylation, which is upstream of NF- $\kappa$ B) prevented the mineralization of VICs induced by LPC (Figure 4c and g). IL-6 silencing (Figure 4d) negated LPC-induced mineralization of VICs (Figure 4e and h). Also, LPC-induced mineralization of VICs was abrogated by a treatment of cell culture with noggin, an inhibitor of bone morphogenetic proteins (BMP) (Figure 4f and i). Thus, these data indicate that LPC mediates the mineralization of VICs through a NF- $\kappa$ B/IL-6/BMP pathway.

***The pro-inflammatory and mineralizing effects of lysophosphatidylcholine are mediated by autotaxin***

We next hypothesized that LPC-mediated activation of NF- $\kappa$ B/IL-6/BMP pathway and mineralization was mediated by ATX, which is also secreted by VICs. To test this

hypothesis, we performed a siRNA for ATX, which reduced significantly the mRNA level and enzyme activity of ATX (Figure 5a and b). The siRNA also reduced by 43% the level of ATX secreted in the supernatant (Figure 5c). In isolated VICs, LPC (100nM) increased the level of mRNA encoding for IL-6 by several-fold, whereas a siRNA for ATX reduced this rise significantly (Figure 5d). These data suggested that LPC promotes the activation of the NF- $\kappa$ B pathway through an ATX-dependent process. To test this hypothesis, we measured the phosphorylation of IKK $\alpha$ . In this experiment, we found that LPC (100nM) increased the phosphorylated IKK $\alpha$  (Ser 176-180)/IKK $\alpha$  ratio, whereas a silencing of ATX abrogated this activation (Figure 5e). The treatment of VICs with LPC (100 nM) also increased the expression of BMP2 by 7.6-fold, whereas a siRNA for ATX reduced significantly this response (figure 5f). A siRNA for ATX negated the LPC-induced rise of transcript encoding for runt related transcription factor 2 (Runx2), a master transcription factor involved in osteogenic transition of cells (Figure 5g). Similarly, the silencing of ATX prevented the LPC-induced rise of osteogenic markers: osteonectin (SPARC) (Figure 5h), alkaline phosphatase (ALP) (Figure 5i) and collagen 1 $\alpha$  (COL1A1) (Figure 5j). The knockdown of ATX also negated the pro-mineralizing effect of LPC (Figure 5k). Hence, these data confirmed that ATX is promoting the inflammation and mineralization of VIC cultures. We next verified if, in turn, inflammation may promote the mineralization of VICs in an ATX dependent manner. We first treated VICs with tumor necrosis  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a known promoter of mineralization in the aortic valve. The addition of TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) for 6 hours in VIC cultures increased the activity of ATX by 156% in cell supernatants, suggesting that it promoted the secretion of ATX by VICs (Figure 5l). In a mineralization assay over 7 days a co-treatment with LPC (100 nM) and TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) increased significantly the calcium content of VIC cultures, whereas a silencing of ATX negated this effect (Figure 5m). Hence, silencing of ATX prevented TNF- $\alpha$ -induced mineralization of VICs.

#### ***Lysophosphatidic acid generated by autotaxin promotes the mineralization of VICs***

Considering that ATX is secreted by VICs and mediates the pro-mineralizing effect of LPC through a NF- $\kappa$ B/IL-6/BMP pathway, we hypothesized that lysophosphatidic acid was the end-product mediating these effects. We treated VICs with Ki16425, an antagonist of lysophosphatidic receptors 1-3 (LPAR1) and (LPAR3), and measured the mRNA level of

IL-6 in response to LPC (100nM). Of interest, Ki16425 blocked the rise of IL-6 transcript induced by LPC (Figure 6a). This finding was next corroborated by measuring IL-6 in supernatants of VIC cultures. In this assay, we found that LPC-induced secretion of IL-6 was prevented by Ki16425 (Figure 6b). Ki16425 also prevented the mineralization of VIC cultures induced by LPC (100 nM) (Figure 6c). These data suggested that LPC is transformed by ATX into lysophosphatidic acid, which has potent pro-inflammatory and pro-mineralizing activities. To test this hypothesis, we treated VICs with lysophosphatidic acid (10 $\mu$ M) (the normal concentration of lysophosphatidic acid in the blood plasma and serum is in the low micromolar range and may surpass 10 $\mu$ M in atherosclerotic plaques) [17] and we measured the production of IL-6 and mineralization levels. In VIC cultures treated with lysophosphatidic acid, we observed a significant increase of IL-6 in supernatants (Figure 6d). We found that lysophosphatidic acid increased the mineralization of VIC cultures by 7.0-fold, whereas Ki16425 negated this process (Figure 6e). Moreover, a siRNA for IL-6 prevented lysophosphatidic acid-induced mineralization of VIC cultures (Figure 6f).

#### ***Lysophosphatidic acid promotes the development of CAVD in mice***

Considering our in vitro findings, we next evaluated if lysophosphatidic acid could promote/accelerate the development of CAVD in a mouse model. LDLR<sup>-/-</sup>/ApoB<sup>100/100</sup>/IGFII transgenic mice (IGFII) develop CAVD under a high-fat/high-sucrose (HF-HS) diet while C57BL/6 mice under HF-HS diet do not develop CAVD [18]. After 6 months of HF-HS diet, a staining for OxPLs with E06 antibody showed an intense signal in leaflets of IGFII mice, whereas OxPLs were barely detectable in aortic valves of C57BL/6 mice (Figure 7a). In immunofluorescence studies we found that the IGFII mice had a higher expression of ATX in aortic leaflets compared to control C57BL/6 (Figure 7b). The level of mRNA encoding for ATX in the aortic root was significantly elevated in the IGFII mice compared to C57BL/6 mice (Figure 7c). In the blood plasma, the ATX activity was increased in the IGFII mice (Figure 7d) and correlated with the blood level of cholesterol (r=0.72, p=0.005) (Figure 7e). Similarly to our human findings, these data suggested that ATX-lysophosphatidic acid may play a role in the development of CAVD. We next treated IGFII mice under HF-HS diet with lysophosphatidic acid (2 nmol, twice weekly i.p.) or with the diluent (control) for 6 months. At 6 months, the blood levels of

cholesterol were similar between IGFII mice treated with the diluent and lysophosphatidic acid (Suppl. Table 1). In both groups of IGFII mice (control and lysophosphatidic acid) the transaortic velocities were significantly increased at 6 months when compared to baseline values (Suppl. Table 2). However, the delta transaortic velocity (value at 6 months – baseline) was increased by 91% in IGFII mice receiving lysophosphatidic acid compared to control IGFII mice (Figure 7f). Consistently, compared to baseline value the aortic valve area measured at 6 months was significantly decreased in IGFII mice receiving lysophosphatidic acid ( $0.765 \pm 0.001 \text{ mm}^2$  vs.  $1.319 \pm 0.001 \text{ mm}^2$ ,  $p=0.03$ ) (Suppl. Table 2). We next used a fluorescent imaging agent (OsteoSense 680EX) to detect hydroxyapatite of calcium in aortic valve leaflets. At 6 months, the signal for hydroxyapatite of calcium in aortic valve leaflets was increased by 1.7-fold in lysophosphatidic acid-treated mice compared to control IGFII mice (Figure 7g). Accordingly, alizarin red staining for minerals performed at 6 months showed a greater amount of staining in aortic valves of lysophosphatidic acid-treated mice (Figure 7h). In the aortic root, the level of mRNA encoding for BMP2 was increased in mice treated with lysophosphatidic acid (Figure 7i). Immunofluorescence studies showed a higher signal for BMP2 in aortic valve leaflets of IGFII mice receiving lysophosphatidic acid injections (Figure 7j). These data suggest that ATX is overexpressed in a mouse model of CAVD and that lysophosphatidic acid promotes and accelerates the development of calcific aortic valve stenosis.

## Discussion

In this study, we identified for the first time, that ATX and lysophosphatidic acid are involved in the pathobiology of CAVD (Figure 8). In this regard, we found that lysophosphatidic acid derived from ATX promoted a strong osteogenic response in VICs and accelerated the development of CAVS in a mouse model.

### *Lp(a) and autotaxin: role in CAVD*

Oxidized-low density lipoprotein (ox-LDL) has been associated with inflammation and the remodelling process of the aortic valve [19-21]. One potent and bioactive mediator of ox-LDL is represented by the OxPLs. The pro-inflammatory property of Lp(a) is believed to be derived from its high content in OxPLs. A high level of OxPLs in small apolipoprotein(a) isoforms is associated with elevated levels of Lp(a) [22]. The recent

discovery that *LPA* gene polymorphism (rs10455872) is causally related to CAVD has raised the question of how Lp(a) promotes the development of CAVD [23]? OxPLs are substrate of Lp-PLA2, which is highly expressed in mineralized aortic valves. [8,24]. Lp-PLA2 produces LPC, a highly reactive lipid metabolite, which is incidentally the substrate for ATX. LPC is also an important component of circulating ox-LDL and present in the aortic valve. In this work, we established that the pro-inflammatory/mineralizing effects of LPC are mediated by ATX. In addition, we found that inflammatory stimuli such as TNF- $\alpha$  promoted the secretion of ATX and increased the mineralization of VICs. Of interest, the promoter region of ATX contains NF- $\kappa$ B consensus site and in isolated Hep3B cells TNF- $\alpha$  induced the production of ATX [25]. In the present work, a knockdown ATX prevented the pro-mineralizing effect of TNF- $\alpha$ . Hence, ATX is induced by inflammatory mediators and is also a potent promoter of inflammation/mineralization. We also established that ATX is likely transported by Lp(a) in the aortic valve. To this effect, ATX activity was elevated by 4.6-fold in the Lp(a) fraction. In addition, by using *in situ* proximity ligation assay, which allows the detection of protein complex interactions, we documented in mineralized aortic valves that ATX interacts with apolipoprotein(a). These facts strongly suggest that ATX is transported in the bloodstream by Lp(a), which accumulates in the aortic valves. Also, we found that VICs express a high level of ATX, which is secreted in the extracellular space where it transforms LPC into lysophosphatidic acid. In IGFII mice with CAVD, the expression of ATX was increased in the aortic valves and in the blood plasma. Although mouse do not have Lp(a), we found a significant correlation between circulating ATX activity and the plasma cholesterol level, suggesting that similarly to our human findings ATX is possibly enriched in lipid fractions. Hence, during CAVD there is a considerable build-up of lysophosphatidic acid, which mediates inflammation and mineralization of the aortic valve.

***Autotaxin: role in inflammation and mineralization of the aortic valve***

Human mineralized aortic valves with an elevated level of ATX had a higher remodelling score and a higher level of inflammation. In this regard, the level of transcript encoding IL-6 was higher in valves with an elevated amount of ATX. Isolated cell experiments confirmed that ATX plays a pivotal role in mediating the pro-inflammatory effect of LPC, an important lipid component derived from OxPL/ox-LDL. We found in isolated VICs that

LPC-induced phosphorylation of IKK $\alpha$ , which is upstream in the NF- $\kappa$ B cascade, was inhibited by silencing ATX. Moreover, in mineralized aortic valves a higher level of ATX mRNA was associated with an elevated level of phosphorylated IKK $\alpha$ . We also found that LPC-induced secretion of IL-6 by VICs was negated by a siRNA targeting ATX. El Hussein et al. previously documented in VICs that secretion of IL-6, a downstream target of NF- $\kappa$ B, promoted the osteogenic transition of cells through the production of BMP2 [16]. We found that LPC induced the rise of osteogenic transcripts including BMP2, Runx2 and osteonectin, whereas a silencing of ATX prevented this effect. Moreover, a knockdown of ATX prevented LPC-induced mineralization of VIC cultures. Hence, these findings indicate that ATX plays a central role in mediating inflammation/mineralization of the aortic valve induced by LPC.

#### ***Lysophosphatidic acid and CAVD***

ATX is the major source of lysophosphatidic acid both in circulation and at the tissue level [26]. The present study showed that when compared to LPC the level of lysophosphatidic acid was higher by several-fold in mineralized aortic valves. Hence, it strongly suggests that ATX, which is highly expressed and enzymatically active in mineralized aortic valves, promotes a sustained conversion of LPC into lysophosphatidic acid with osteogenic properties. In VIC cultures, lysophosphatidic acid induced the mineralization of cells which was negated by a silencing of IL-6, suggesting that lysophosphatidic acid promoted the osteogenic transition of VICs through an inflammatory pathway. Zhou et al. showed that administration of lysophosphatidic acid (at the same dose used in the present study) for 4 weeks accelerated inflammation and atherosclerosis development in apoE<sup>-/-</sup> mice [27]. In the present study, we found that administration of lysophosphatidic acid for 6 months in IGFII mice elevated the expression of BMP2 and greatly increased the deposition of hydroxyapatite of calcium in aortic valve leaflets and accelerated the development of aortic stenosis. Taken together, these findings indicate that lysophosphatidic acid promotes the mineralization of the aortic valve through a NF- $\kappa$ B/IL-6/BMP pathway.

#### ***Clinical implications***

This work has potentially important translational impact. We demonstrated that a high level of ATX, which is transported by Lp(a) and also secreted by VICs, is an important driver of the mineralization of the aortic valve. In a mouse model, lysophosphatidic acid, a

downstream product of ATX, increased the deposition of calcium in aortic valve leaflets and increased the rise of transaortic velocities by 91%. Mineralization of the aortic valve is regarded as a major culprit in the development/progression of CAVD. Hence, a pharmacological treatment that could stop or prevent ectopic mineralization of the aortic valve could lead to novel form of therapy for CAVD. In this regard, inhibition of ATX or blocking LPAR1-3 could represent novel avenues that warrant further research [28].

### **Limitations**

The expression of ATX was documented in human aortic valves with an advanced pathologic process. Hence, correlation between ATX and the remodelling score was limited to tissues with an advanced disease, thus limiting the range of variation.

## **Conclusion**

In this work, we highlighted that ATX-lysophosphatidic acid promotes the mineralization of the aortic valve through a NF- $\kappa$ B/IL-6/BMP pathway. ATX and lysophosphatidic acid could represent novel potential targets in the treatment of CAVD.

## **Acknowledgments**

This work was supported in part by the Quebec Heart and Lung Institute Fund. A. M. is supported by studentship grants of the Quebec Heart and Lung Institute Fund. Y.B., B.J.A and P.M. are research scholars from the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS), Montreal, Québec, Canada.

## **Disclosures**

No conflict of interest

## **References**

- (1) Messika-Zeitoun D, Aubry MC, Detaint D, Bielak LF, Peyser PA, Sheedy PF, Turner ST, Breen JF, Scott C, Tajik AJ, Enriquez-Sarano M. Evaluation and clinical

- implications of aortic valve calcification measured by electron-beam computed tomography. *Circulation* 2004;110:356-62.
- (2) Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation* 2011;124:1783-91.
  - (3) Otto CM. Calcific aortic stenosis--time to look more closely at the valve. *N Engl J Med* 2008;359:1395-8.
  - (4) Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, Kerr KF, Pechlivanis S, Budoff MJ, Harris TB, Malhotra R, O'Brien KD, Kamstrup PR, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Allison MA, Aspelund T, Criqui MH, Heckbert SR, Hwang SJ, Liu Y, Sjogren M, van der Pals J, Kalsch H, Muhleisen TW, Nothen MM, Cupples LA, Caslake M, Di AE, Danesh J, Rotter JI, Sigurdsson S, Wong Q, Erbel R, Kathiresan S, Melander O, Gudnason V, O'Donnell CJ, Post WS. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med* 2013;368:503-12.
  - (5) Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:470-7.
  - (6) Arsenault BJ, Boekholdt SM, Dube MP, Rheume E, Wareham NJ, Khaw KT, Sandhu MS, Tardif JC. Lipoprotein(a) Levels, Genotype and Incident Aortic Valve Stenosis: A Prospective Mendelian Randomization Study and Replication in a Case-Control Cohort. *Circ Cardiovasc Genet* 2014;34:457-62.
  - (7) O'Donoghue ML, Morrow DA, Tsimikas S, Sloan S, Ren AF, Hoffman EB, Desai NR, Solomon SD, Domanski M, Arai K, Chiuve SE, Cannon CP, Sacks FM,

- Sabatine MS. Lipoprotein(a) for risk assessment in patients with established coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:520-7.
- (8) Mahmut A, Boulanger MC, El Husseini D, Fournier D, Bouchareb R, Despres JP, Pibarot P, Bosse Y, Mathieu P. Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:460-9.
- (9) Leibundgut G, Scipione C, Yin H, Schneider M, Boffa MB, Green S, Yang X, Dennis E, Witztum JL, Koschinsky ML, Tsimikas S. Determinants of binding of oxidized phospholipids on apolipoprotein (a) and lipoprotein (a). *J Lipid Res* 2013;54:2815-30.
- (10) Liu SY, Lu X, Choy S, Dembinski TC, Hatch GM, Mymin D, Shen X, Angel A, Choy PC, Man RY. Alteration of lysophosphatidylcholine content in low density lipoprotein after oxidative modification: relationship to endothelium dependent relaxation. *Cardiovasc Res* 1994;28:1476-81.
- (11) Wu R, Huang YH, Elinder LS, Frostegard J. Lysophosphatidylcholine is involved in the antigenicity of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:626-30.
- (12) Lehti S, Kakela R, Horkko S, Kummu O, Helske-Suihko S, Kupari M, Werkkala K, Kovanen PT, Oorni K. Modified lipoprotein-derived lipid particles accumulate in human stenotic aortic valves. *PLoS One* 2013;8:e65810.
- (13) Nakanaga K, Hama K, Aoki J. Autotaxin--an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem* 2010;148:13-24.
- (14) Sun W, Li H, Yu Y, Fan Y, Grabiner BC, Mao R, Ge N, Zhang H, Fu S, Lin X, Yang J. MEKK3 is required for lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation. *Cell Signal* 2009;21:1488-94.
- (15) Schober A, Siess W. Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases. *Br J Pharmacol* 2012;167:465-82.

- (16) El Husseini D, Boulanger MC, Mahmut A, Bouchareb R, Laflamme MH, Fournier D, Pibarot P, Bosse Y, Mathieu P. P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: Implication for calcific aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol* 2014;72:146-56.
- (17) Baker DL, Desiderio DM, Miller DD, Tolley B, Tigyi GJ. Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 2001;292:287-95.
- (18) Le Quang K, Bouchareb R, Lachance D, Laplante MA, Husseini DE, Boulanger MC, Fournier D, Fang XP, Avramoglu RK, Pibarot P, Deshaies Y, Sweeney G, Mathieu P, Marette A. Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:2283-91.
- (19) Cote C, Pibarot P, Despres JP, Mohty D, Cartier A, Arsenault BJ, Couture C, Mathieu P. Association between circulating oxidised low-density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis. *Heart* 2008;94:1175-80.
- (20) Cote N, Pibarot P, Pepin A, Fournier D, Audet A, Arsenault B, Couture C, Poirier P, Despres JP, Mathieu P. Oxidized low-density lipoprotein, angiotensin II and increased waist circumference are associated with valve inflammation in prehypertensive patients with aortic stenosis. *Int J Cardiol* 2010;145:444-9.
- (21) Mohty D, Pibarot P, Despres JP, Cote C, Arsenault B, Cartier A, Cosnay P, Couture C, Mathieu P. Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:187-93.
- (22) Taleb A, Witztum JL, Tsimikas S. Oxidized phospholipids on apoB-100-containing lipoproteins: a biomarker predicting cardiovascular disease and cardiovascular events. *Biomark Med* 2011;5:673-94.

- (23) Hung MY, Witztum JL, Tsimikas S. New therapeutic targets for calcific aortic valve stenosis: the lipoprotein(a)-lipoprotein-associated phospholipase A2-oxidized phospholipid axis. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:478-80.
- (24) Mahmut A, Mahjoub H, Boulanger MC, Fournier D, Despres JP, Pibarot P, Mathieu P. Lp-PLA2 is associated with structural valve degeneration of bioprostheses. *Eur J Clin Invest* 2013.
- (25) Wu JM, Xu Y, Skill NJ, Sheng H, Zhao Z, Yu M, Saxena R, Maluccio MA. Autotaxin expression and its connection with the TNF-alpha-NF-kappaB axis in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 2010;9:71.
- (26) Perrakis A, Moolenaar WH. Autotaxin: structure-function and signaling. *J Lipid Res* 2014;55:1010-8.
- (27) Zhou Z, Subramanian P, Sevilmis G, Globke B, Soehnlein O, Karshovska E, Megens R, Heyll K, Chun J, Saulnier-Blache JS, Reinholz M, van ZM, Weber C, Schober A. Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab* 2011;13:592-600.
- (28) Federico L, Pamuklar Z, Smyth SS, Morris AJ. Therapeutic potential of autotaxin/lysophospholipase d inhibitors. *Curr Drug Targets* 2008;9:698-708.

## Tables

Variables	Control valves (n=12)	CAVD (n=35)	p-value
Age	60 ± 1	68 ± 2	0.0001
Male (%)	67	57	0.73
Smoking (%)	0	20	0.17
Hypertension (%)	33	69	0.044
Diabetes mellitus (%)	42	31	0.72
Coronary heart disease (%)	67	46	0.31
Bicuspid aortic valves (%)	0	34	0.021
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.2 ± 1.7	27.6 ± 0.8	0.56
Statins (%)	100	94	1
Aortic valve area (cm <sup>2</sup> )	--	0.79 ± 0.03	--
Aortic mean gradient(mmHg)	--	40.6 ± 1.9	--
Triglycerides (mmol/L)	1.44 ± 0.08	1.44 ± 0.12	0.50
LDL (mmol/L)	2.33 ± 0.46	2.20 ± 0.16	0.59
HDL (mmol/L)	1.03 ± 0.07	1.27 ± 0.06	0.017
Creatinine (µmol/L)	135.4 ± 17.8	90.7 ± 4.4	0.015
Creatinine clearance(ml/min)	55.6 ± 6.4	74.2 ± 3.5	0.011

**Table 5-1.** Clinical characteristics of patients for ATX activity. **Legend:** Values are mean±SEM or %; P values: Student t test or Fisher exact test. ATX indicates autotaxin; BMI, body mass index; CAVD, calcific aortic valve disease; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; and SEM, standard error of the mean.

**Table 5-2.** Clinical Characteristics of Age and Sex-Matched patients. **Legend:** Values

Variables	Control valves (n=12)	CAVD (n=12)	p-value
Age	60 ± 1	61 ± 1	0.70
Male (%)	67	67	1
Smoking (%)	0	25	0.21
Hypertension (%)	33	83	0.036
Diabetes mellitus (%)	42	42	1
Coronary heart disease (%)	67	42	0.41
Bicuspid aortic valves (%)	0	67	0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.2 ± 1.7	28.3 ± 1.4	0.47
Statins (%)	100	83	0.47
Aortic valve area (cm <sup>2</sup> )	--	0.81 ± 0.07	--
Aortic mean gradient(mmHg)	--	40.2 ± 5.7	--
Triglycerides (mmol/L)	1.44 ± 0.08	1.52 ± 0.22	0.38
LDL (mmol/L)	2.33 ± 0.46	1.99 ± 0.21	0.74
HDL (mmol/L)	1.03 ± 0.07	1.20 ± 0.09	0.097
Creatinine (µmol/L)	135.4 ± 17	91.0 ± 8.4	0.019
Creatinine clearance(ml/min)	55.6 ± 6	78.2 ± 6	0.013

are mean±SEM or %; P values: Student t test or Fisher exact test. BMI indicates body mass index; CAVD, calcific aortic valve disease; HDL, highdensity lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; and SEM, standard error of the mean.

Variables	CAVD (n=67)
Age	70 ± 1
Male (%)	57
Smoking (%)	9
Hypertension (%)	60
Diabetes (%)	25
Coronary heart disease (%)	45
Bicuspid aortic valves (%)	25
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.7 ± 1
Statins (%)	57
Aortic valve area (cm <sup>2</sup> )	0.77 ± 0.02
Aortic mean gradient(mmHg)	40.6 ± 1.7
Triglycerides (mmol/L)	1.41 ± 0.07
LDL (mmol/L)	2.31 ± 0.11
HDL (mmol/L)	1.35 ± 0.04
Creatinine (µmol/L)	88.6 ± 3
Creatinine clearance(ml/min)	73.2 ± 2.3

**Table 5-3.** Clinical Characteristics of Patients. **Legend:** Values are mean±SEM or %. BMI indicates body mass index; CAVD, calcific aortic valve disease; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; and SEM, standard error of the mean.

## Figures legends

### Figure 5-1: Autotaxin, its substrate (LPC) and product (lysophosphatidic acid) in calcific aortic valve disease

a-c) Measurements of ATX lysophospholipase D activity in human tissues; control (CTL) (n=12) versus calcified (CAVD) valves (n=35) (a), calcified tricuspid (n=23) and bicuspid valves (n=12) (b), and in age- and gender-matched control (n=12) versus calcified valves (n=12) (c). d) Representative western blot analysis showing levels of ATX for 6 control and 6 CAVD valves; Western blot were performed in control (n=12) versus calcified tissues (n=15) and quantified. e-f) Representative thin layer chromatography analysis of lysophosphatidic acid (LPA) and lysophosphatidylcholine (LPC) in control and mineralized aortic valves (e); quantification of the amount of lysophosphatidic acid (LPA) in control (CTL) (n=5) vs. CAVD (n=7) (f). g) Level of LPA vs. LPC in CAVD tissues. \*  $p < 0.05$  compared with control valves. RFU: relative fluorescent unit. In panels d, f and g values are mean  $\pm$  SEM. In panels a-c distributions are shown with box-plot graphs showing interquartile range (box) and 95% confidence interval (bars). p values: Wilcoxon-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test; \*  $p < 0.05$  for intergroup comparison with Steel-Dwass test. ATX indicates autotaxin; CAVD, calcific aortic valve disease; RFU, relative fluorescent unit; and SEM, standard error of the mean

### Figure 5-2: Autotaxin co-localized with Lp(a) in the aortic valve

a) Immunohistochemistry studies of ATX in control non-mineralized and CAVD tissues (representative of 15 controls and 15 CAVD); b) Immunostainings for ATX, oxidized-LDL (ox-LDL), oxidized phospholipids (OxPLs), Lp(a), Lp-PLA2 and control with secondary antibody alone in mineralized aortic valves. Scale bar 150 $\mu$ M. c) Confocal images showing the co-localization (appears in yellow) of Lp(a) and ATX. The DIC image shows the region where images were acquired on the tissue. Scale bar 40 $\mu$ M. d) Measurements of ATX activity in blood plasma and Lp(a) fraction from healthy donors (n=5). e) Cartoon of the proximity ligation assay. f) Confocal analysis of proximity ligation assay displaying interactions between ATX and apolipoprotein(a) (red dots) (representative of n=3). Scale bar 40 $\mu$ M. Values are mean  $\pm$  SEM. RFU: relative fluorescent unit. p value: Wilcoxon-

Mann-Whitney test. AB indicates antibody; ATX, autotaxin; CAVD, calcific aortic valve disease; CTL, control; Dapi, 4',6-diamidino-2 phenylindole; DIC, differential interference contrast; Lp(a), lipoprotein(a); Lp-PLA2, lipoprotein-associated phospholipase A2; RFU, relative fluorescent unit; and SEM, standard error of the mean.

**Figure 5-3: Autotaxin is expressed by VICs and correlates with indices of tissue remodelling and inflammation of the valve**

a and b) Confocal images showing co-expression of vimentin (a marker expressed by VICs) and ATX in stenotic aortic valves (a) and peri-nuclear localization of ATX in isolated VICs (b). Scale bars 20 $\mu$ M. c-d) mRNA levels of ATX (dichotomized at median value) and relationships with the remodelling score (n=67) (c) and IL-6 mRNA (d). e-f) IKK $\alpha$  and ratio of phosphorylated IKK $\alpha$  over total IKK $\alpha$  according to ATX mRNA levels (dichotomized at the median value) (n=10). Values are mean  $\pm$  SEM. p values: Wilcoxon-Mann-Whitney test. ATX indicates autotaxin; Dapi, 4',6-diamidino-2 phenylindole; IKK $\alpha$ , I $\kappa$ B kinase  $\alpha$ ; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase; IL-6, interleukin 6; pIKK $\alpha$ , phosphorylated IKK $\alpha$ ; SEM, standard error of the mean; and VIC, valve interstitial cell.

**Figure 5-4: Lysophosphatidylcholine mediates mineralization by stimulating the NF- $\kappa$ B/IL-6/BMP pathway in VICs**

a) Epifluorescence images showing translocation of p65 subunit of NF- $\kappa$ B from the cytosol to the nucleus in response to LPC (100 nM) treatment. Scale bar 40 $\mu$ M. b) ELISA measurement of secreted IL-6 in isolated VIC cultures treated with LPC (100nM) for 24 hours (n=6). c) LPC-induced mineralization of VICs with or without I $\kappa$ B phosphorylation inhibitor, BAY11-7085 (n=6). d) Quantification of IL-6 silencing by real time PCR (n=5). e and f) LPC-induced mineralization with or without siIL-6 treatment (e) or the BMP inhibitor noggin (f) (n=6). Experiments in panels c, e and f were independently corroborated by using alizarin red staining shown below the graphs showing biochemical determination of calcium (g-i) (n=3). Values are mean  $\pm$  SEM. LPC (lysophosphatidylcholine): 100 nM; Noggin: 2.5 $\mu$ M. p values: Wilcoxon-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test; \* p < 0.05 for intergroup comparison with Steel-Dwass test. BMP

indicates bone morphogenetic protein; CTL, control; Dapi, 4',6-diamidino-2-phenylindole; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase; IL-6, interleukin 6; LPC, lysophosphatidylcholine; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; PCR, polymerase chain reaction; SEM, standard error of the mean; siCTL, scramble small interfering RNA for negative control; siIL-6, small interfering RNA for IL-6; and VIC, valve interstitial cell.

**Figure 5-5: Knockdown of autotaxin blocked LPC-induced inflammatory and mineralizing effects in VICs**

a-c) Reduced ATX mRNA (a) (n=6), ATX activity (b) (n=5), and secreted ATX level (c) (n=7), by siRNA silencing. d-h) Effect of silencing ATX on LPC-induced rise of IL-6 mRNA (d) (n=5), phospho-IKK $\alpha$ /IKK $\alpha$  ratio (e) (n=5), BMP2 mRNA (f) (n=5), Runx2 mRNA (g) (n=5), osteonectin (h) (n=5), ALP (i) (n=5) and COL1A1 mRNA levels (j) (n=5). k) Effect of silencing ATX on LPC-induced mineralization of VICs (n=6). l) ATX activity in VIC supernatants in control and after TNF- $\alpha$  treatment for 24 hours (n=6). m) Mineralization of VICs after 7 days (n=6) following treatment with LPC with or without TNF- $\alpha$  and silencing of ATX. Values are mean  $\pm$  SEM. LPC: 100 nM; TNF- $\alpha$ : 10 ng/ml; p values: Wilcoxon-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test; \* p < 0.05 for intergroup comparison with Steel-Dwass test. ALP indicates alkaline phosphatase; ATX, autotaxin; BMP2, bone morphogenetic protein 2; IKK $\alpha$ , I $\kappa$ B kinase  $\alpha$ ; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase; IL-6, interleukin 6; LPC, lysophosphatidylcholine; Runx2, runt-related transcription factor 2; SEM, standard error of the mean; siATX, small interfering RNA for autotaxin; siCTL, scramble small interfering RNA for negative control; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; and VIC, valve interstitial cell.

**Figure 5-6: Lysophosphatidic acid promotes VICs mineralization**

a-c) Effect of LPAR1-3 inhibitor, Ki16425, on LPC-induced IL-6 mRNA expression (a) (n=6), secretion of IL-6 (b) (n=6) and LPC-mediated mineralization (c) (n=6). d) LPA (10 $\mu$ M) treatment increased IL-6 production (n=5). e) Effect of Ki16425 on LPA-induced mineralization (n=6). f) Effect of silencing IL-6 on LPA-mediated mineralization (n=6). a, b) \* p < 0.05 compared with control (CTL); # p < 0.05 compared with LPC. Values are

mean  $\pm$  SEM. LPC:100 nM; LPA (lysophosphatidic acid): 10 $\mu$ M; Ki16425:10 $\mu$ M; p values: Wilcoxon-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test; \* p < 0.05 for intergroup comparison with Steel-Dwass test. CTL indicates control; HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase; IL-6, interleukin 6; LPA, lysophosphatidic acid; LPAR1–3, lysophosphatidic receptors 1 to 3; LPC, lysophosphatidylcholine; SEM, standard error of the mean; siCTL, scramble small interfering RNA for negative control; and siIL-6, small interfering RNA for IL-6.

### **Figure 5-7: ATX and lysophosphatidic acid in a mouse model of CAVD**

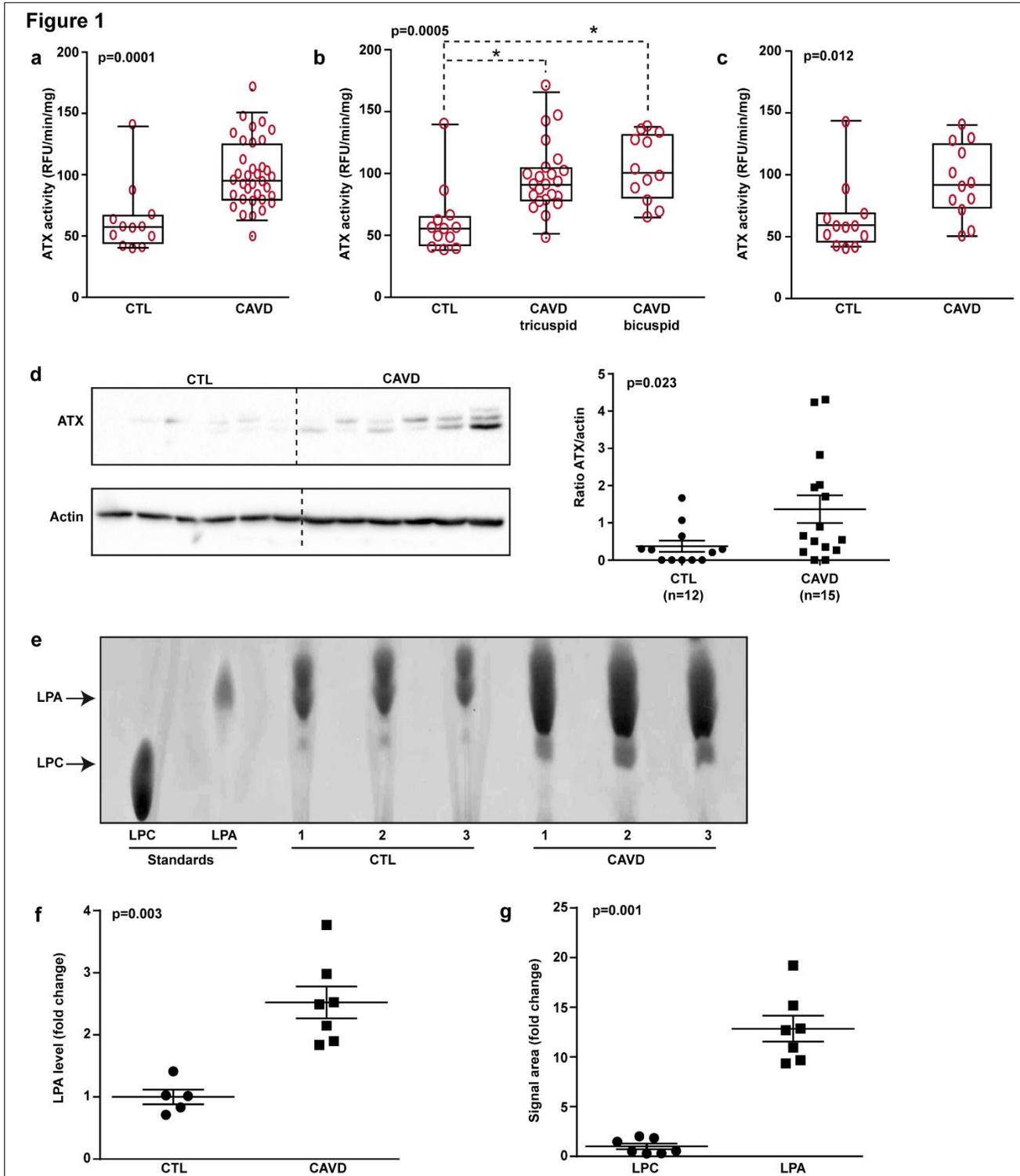
a) Immunohistochemistry analyses of oxidized phospholipids (OxPLs) in aortic valve leaflets of C57/BL7 mice (C57) and LDLR<sup>-/-</sup>/ApoB<sup>100/100</sup>/IGFII transgenic mice (IGFII). Scale bar 100 $\mu$ M. b) Epifluorescence images of ATX and fluorescent signal quantification of aortic valve leaflets (n=12). Scale bars; 4X: 500 $\mu$ M, 10X: 100 $\mu$ M and 40X: 20 $\mu$ M. c) Level of ATX mRNA in aortic root (n=12). d) ATX activity in blood plasma (n=10). e) Correlation between plasma ATX activity and blood cholesterol level (n=10). f) Delta (6 months-baseline) for transaortic velocity measurements in control (IGFII) and lysophosphatidic acid-treated IGFII mice (LPA) (n=12). g) Spectral images showing signal intensities of calcified areas (hydroxyapatite) in mice aortic valve leaflets labeled with Osteosense 680EX. Scale bars; 10X: 100 $\mu$ M and 40X: 20 $\mu$ M. h) Alizarin red staining (for calcium) seen in polarized light and quantification of mineralized areas in control IGFII and LPA-treated IGFII mice (n=12). Scale bar 100 $\mu$ M. i) BMP2 mRNA levels in aortic root in control IGFII and LPA-treated IGFII mice (n=12). j) Epifluorescence images showing the expression of BMP2 in aortic valve leaflets of control IGFII and LPA-treated IGFII mice (n=11). Scale bar: 100 $\mu$ M. Values are mean  $\pm$  SEM; p values: Wilcoxon-Mann-Whitney test. ATX indicates autotaxin; BMP2, bone morphogenetic protein 2; CAVD, calcific aortic valve disease; and SEM, standard error of the mean.

### **Figure 5-8: Working model for ATX in CAVD**

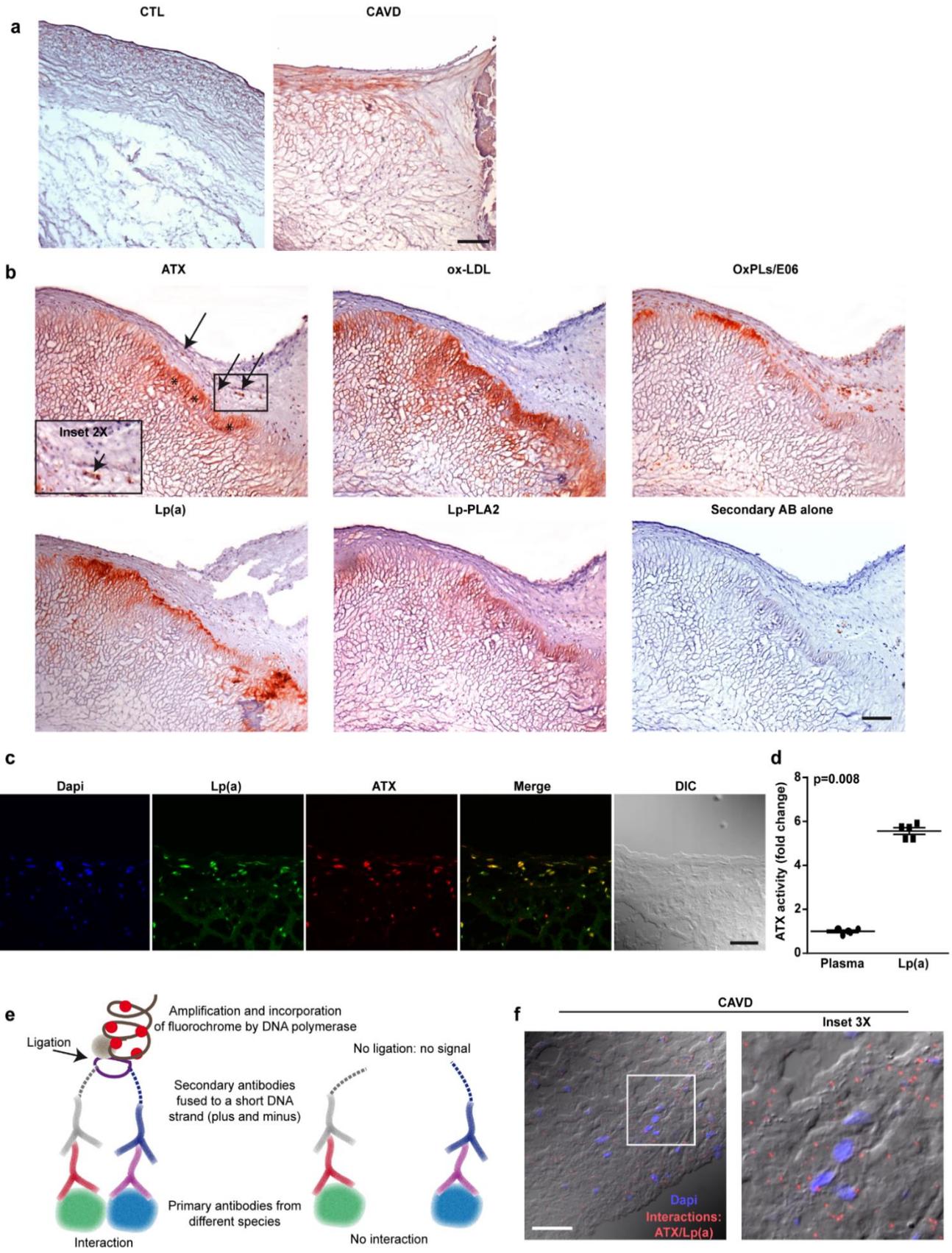
Schematic representation of the pathway involved in autotaxin-mediated inflammation, mineralization and osteogenic transition. ATX indicates autotaxin; BMP2, bone morphogenetic protein 2; CAVD, calcific aortic valve disease; IL-6, interleukin 6; Lp(a),

lipoprotein(a); LPAR, lysophosphatidic receptor; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; and VIC, valve interstitial cell.

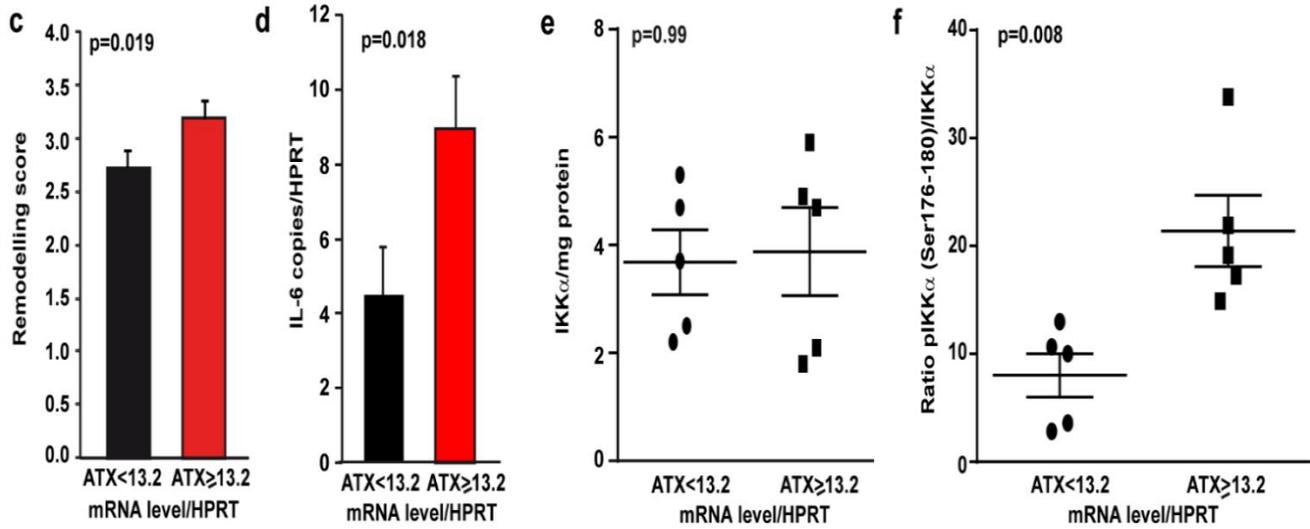
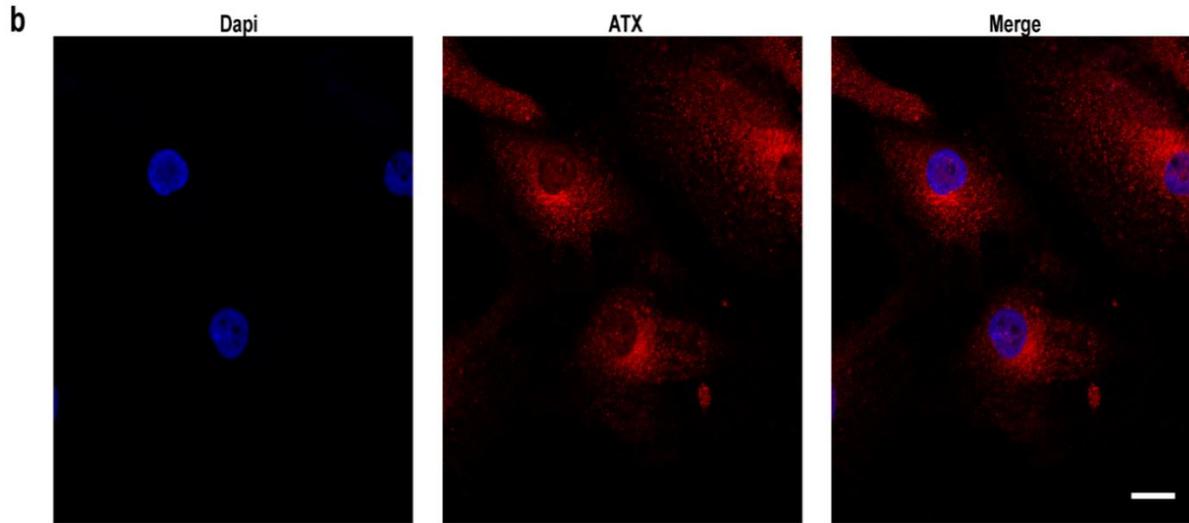
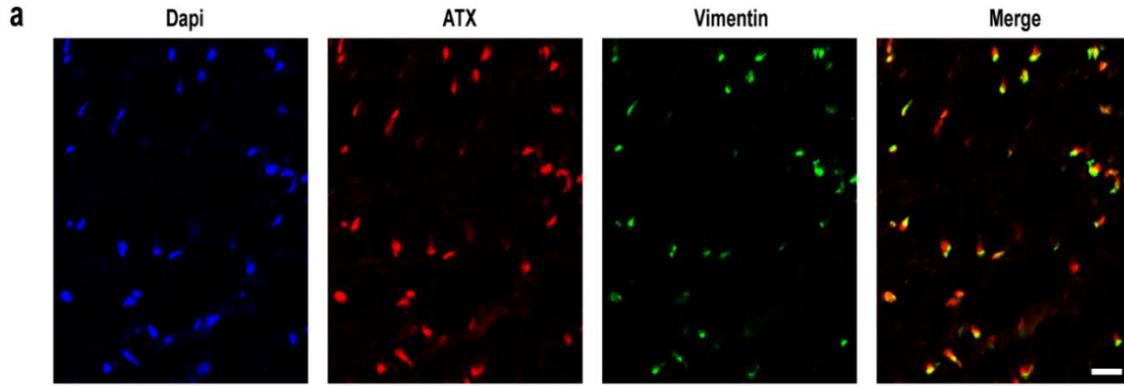
# Figures



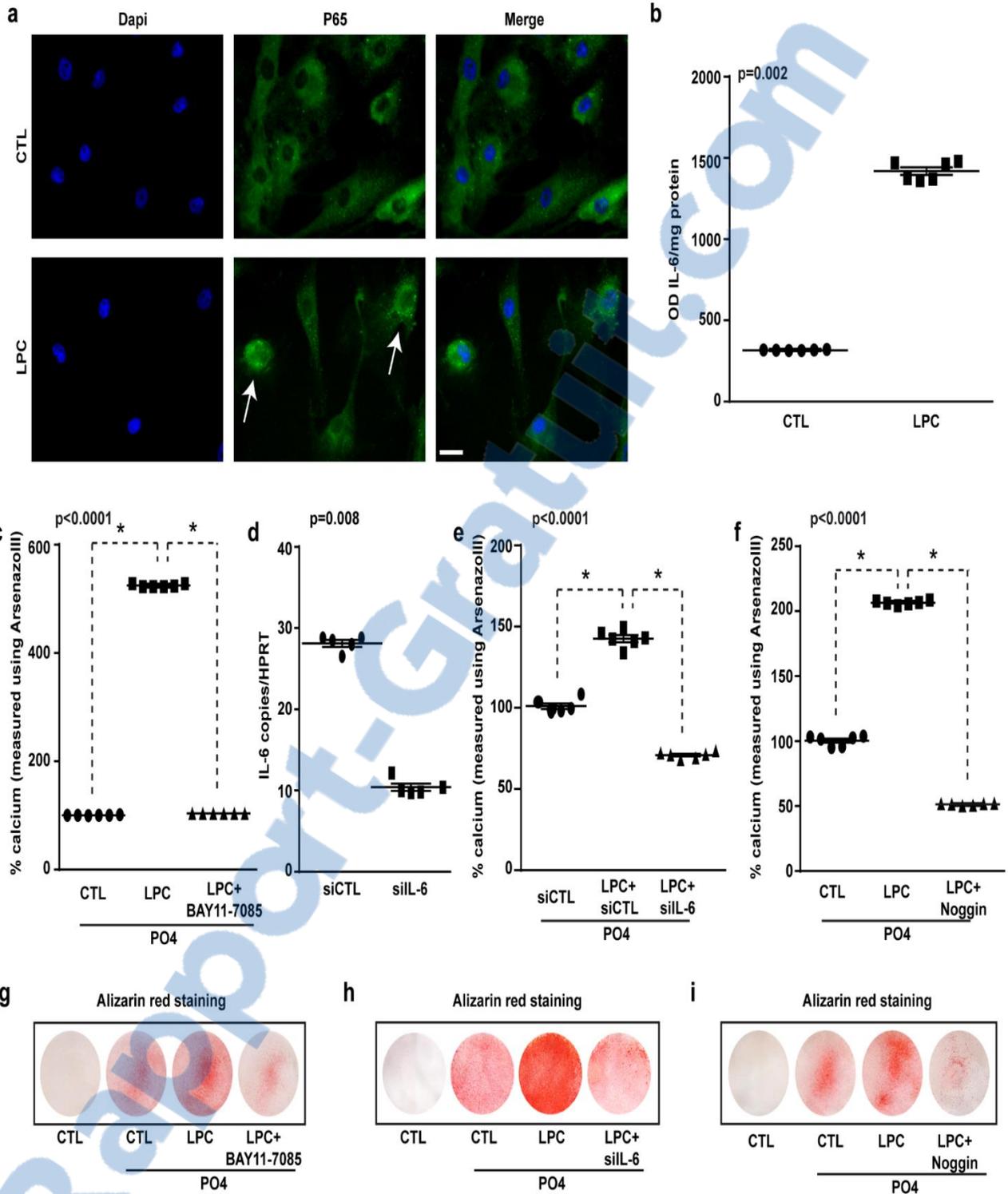
**Figure 2**



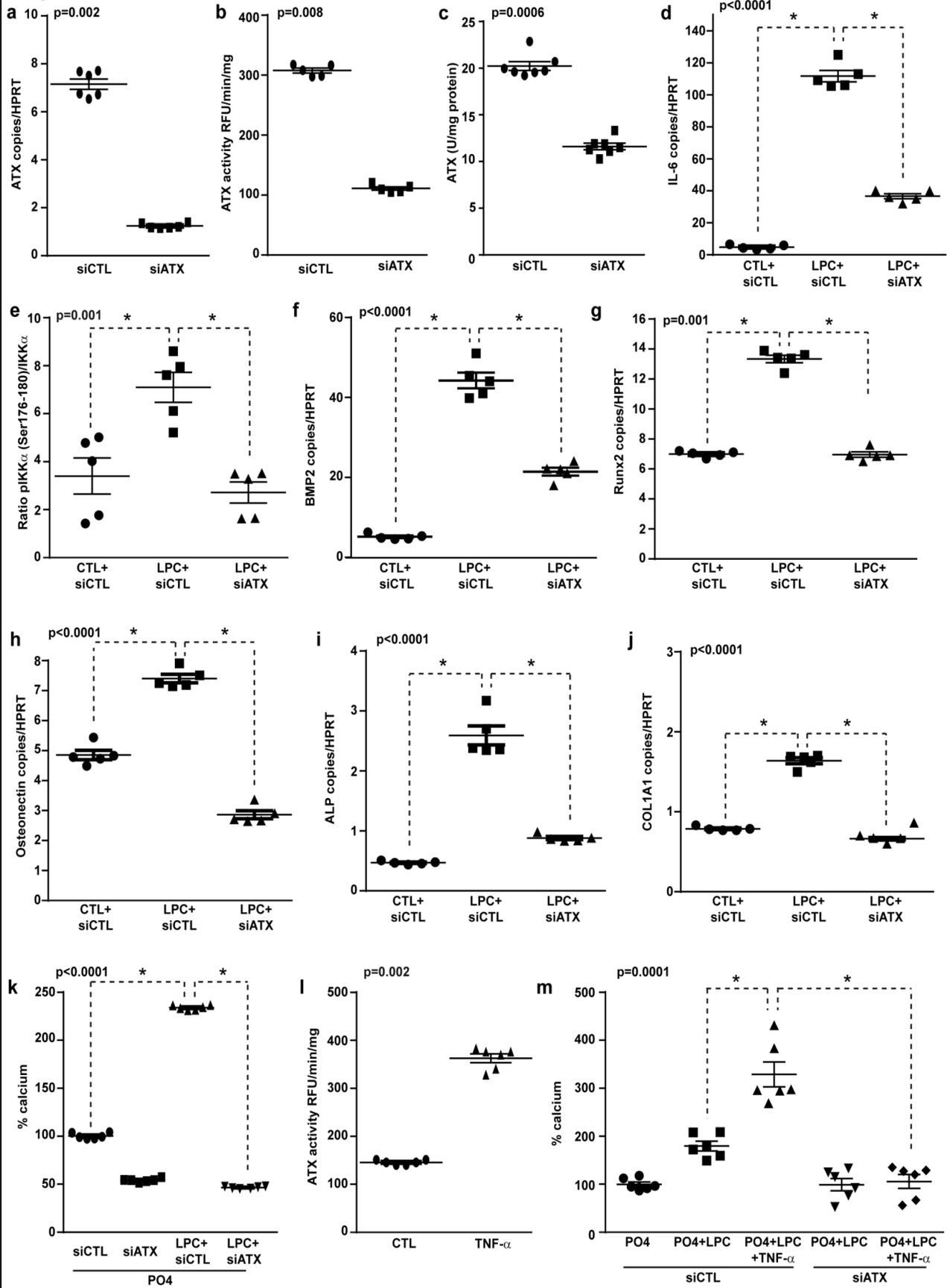
**Figure 3**



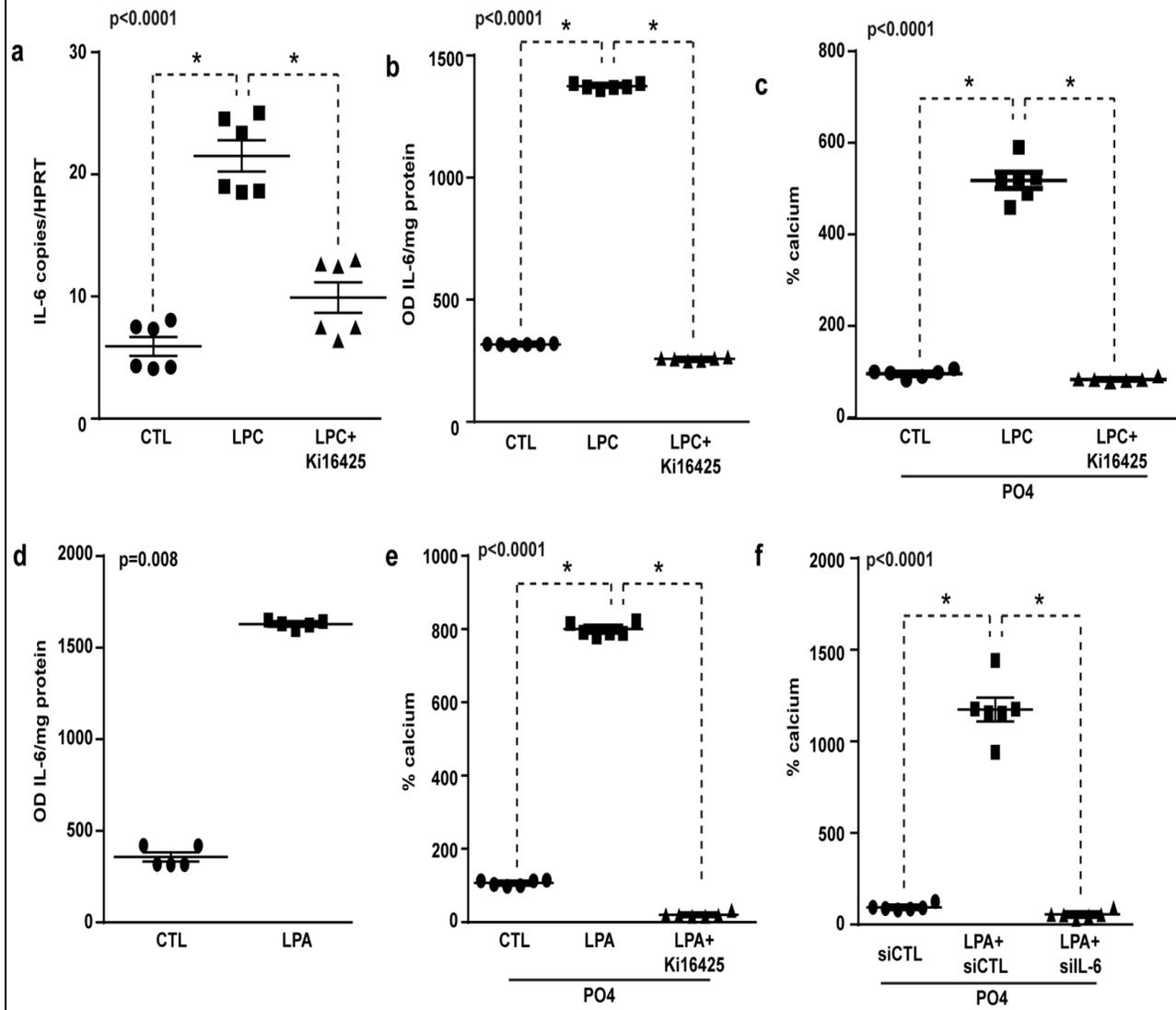
**Figure 4**



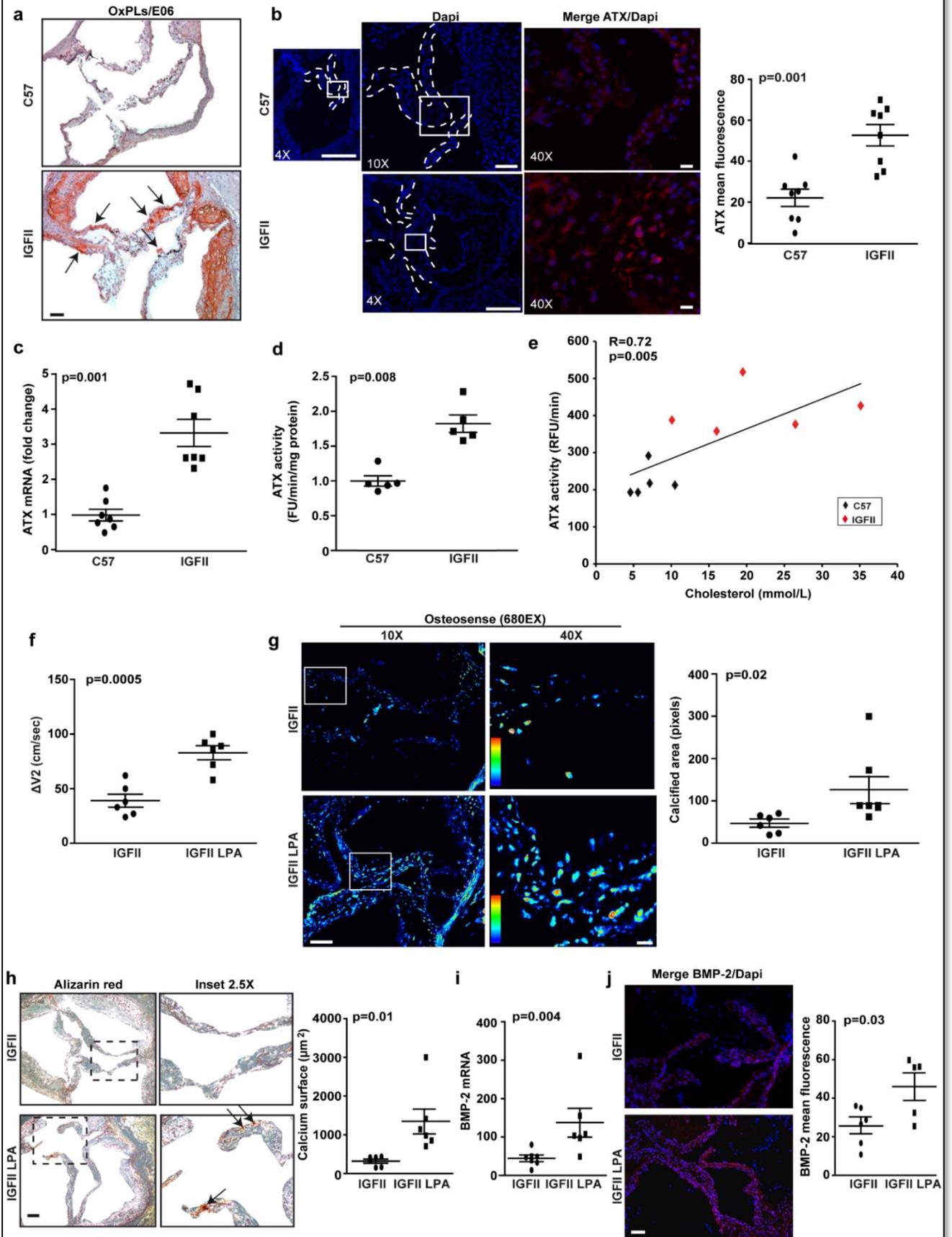
**Figure 5**



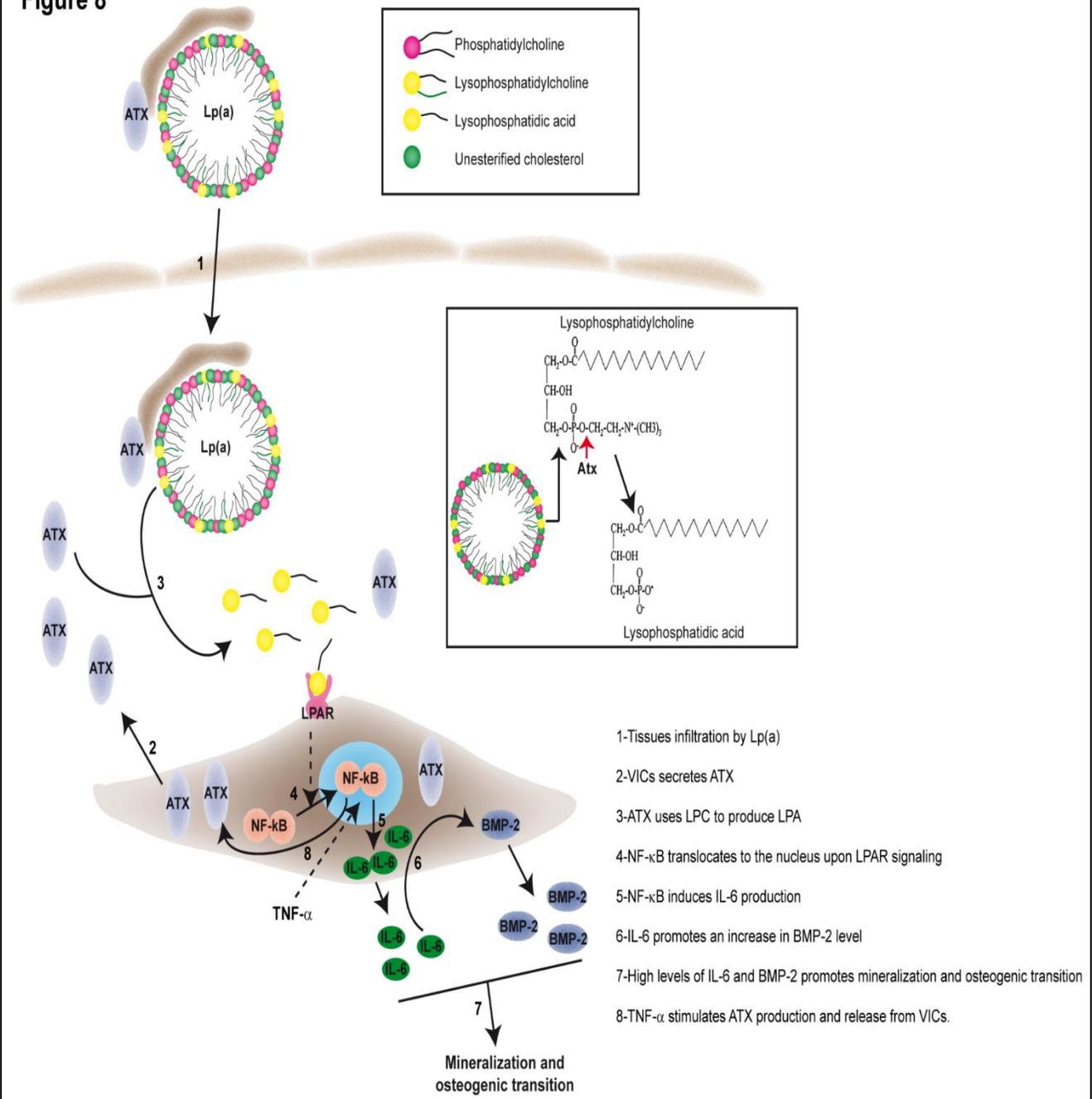
**Figure 6**



**Figure 7**



**Figure 8**



## Supplementary tables

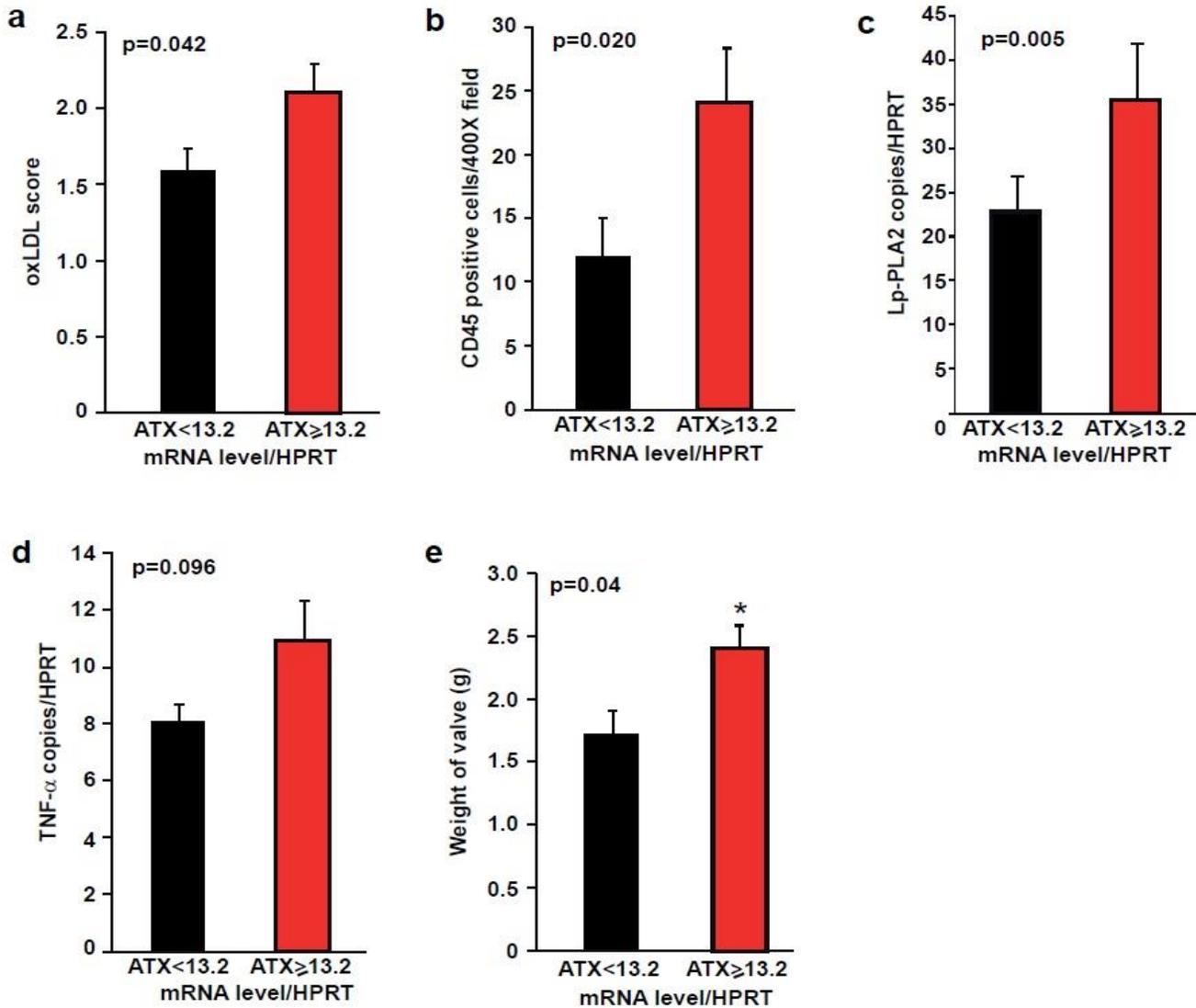
	IGFII	IGFII LPA	P-value
<b>Cholesterol (mmol/l)</b>	16.2±2.0	16.0±2.8	0.89
<b>Triglycerides (mmol/l)</b>	1.2±0.3	1.4±0.4	0.25
<b>Glucose (mmol/l)</b>	8.5±0.8	8.8±1.2	0.60

**Supplementary tables 1:** Assessment of biological parameters in IGFII mice. **Legend:** Values are mean±SEM or %; SEM, standard error of the mean.

	IGFII			IGFII LPA		
	Baseline	6 months	p	Baseline	6 months	p
<b>Mice weight (g)</b>	24±3	39±2	0.001	24±5	35±5	0.001
<b>LV systolic function</b>						
FS (%)	39±4	34±4	0.005	39±3	33±5	0.011
EF (%)	77±4	69±7	0.021	77±4	69±7	0.031
SV (ml)	0.06±0.01	0.06±0.01	0.080	0.06±0.01	0.06±0.01	0.70
Heart rate (bpm)	337±32	412±91	0.062	349±79	397±93	0.30
CO (ml)	19±3	28±8	0.012	19±6	21±6	0.70
<b>LV diastolic function</b>						
E/E'	26.6±3.2	24.7±3.4	0.30	23.2±1.8	38.5±2.1	0.003
<b>Aortic Valve Hemodynamics</b>						
Peak aortic jet velocity (cm/s)	96.1±18.0	138.2±8.6	0.003	89.8±10.8	171.0±22.3	<0.0001
Peak LVOT velocity (cm/s)	90.7±14.5	100.0±17.6	0.12	82.4±6.7	88.2±13.5	0.18
LVOT area (mm <sup>2</sup> )	1.42±0.11	1.58±0.09	0.54	1.43±0.16	1.46±0.11	0.34
AVA (mm <sup>2</sup> )	1.31±0.14	1.18±0.20	0.43	1.32±0.12	0.77±0.14	0.030

**Supplementary tables 2:** Echocardiographic parameters in IGFII mice. **Legend:** Values are mean±SEM or %; P values: Student t test or Fisher exact test; LV: left ventricle, FS: fractional shortening, EF: ejection fraction, SV: stroke volume, CO: cardiac output, E/E': mitral inflow, LVOT: left ventricular outflow tract, AVA: aortic valve area, and SEM, standard error of the mean.

## Supplementary Figures



**Supplementary figure 1:** Relationships between ATX level (dichotomized at the median value) and (a) ox-LDL score (b) CD45 positive cells (c) Lp-PLA2 mRNA levels (d) TNF- $\alpha$  mRNA levels and (e) weight of aortic valve. p values: Wilcoxon-Mann-Whitney

# Chapitre 6: Article 3

## **OxLDL-derived lysophosphatidic acid promotes the progression of aortic valve stenosis through a LPAR1-RhoA-NF- $\kappa$ B pathway**

Mohamed Jalloul Nsaibia, MSc<sup>1</sup>; Marie-Chloé Boulanger, PhD<sup>1</sup>; Rihab Bouchareb, PhD<sup>1</sup>; Ghada Mkannez, PhD<sup>1</sup>; Khai Le Quang, MD, PhD<sup>1</sup>; Fayez Hadji, MSc<sup>1</sup>; Deborah Argaud, MSc<sup>1</sup>; Abdellaziz Dahou, MD, MSc<sup>2</sup>; Yohan Bossé, PhD<sup>2</sup>; Marlys L. Koschinsky, PhD<sup>3</sup>; Philippe Pibarot, DVM, PhD<sup>2</sup>; Benoit J. Arsenault, PhD<sup>2</sup>; André Marette, PhD<sup>2</sup>; Patrick Mathieu, MD, MSc, FRCSC<sup>1</sup>

**Cardiovascular Research (2017) 113, 1351–1363**

<sup>1</sup>Laboratory of Cardiovascular Pathobiology, Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec/Quebec Heart and Lung Institute, Research Center, Department of Surgery, Laval University, Quebec, Canada

<sup>2</sup>Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec/Quebec Heart and Lung Institute, Research Center, Laval University, Quebec, Canada

<sup>3</sup>Western University, London, Ontario, Canada

**Keywords:** Calcific aortic valve stenosis; calcific aortic valve disease; lysophosphatidic acid; OxLDL, LPAR1; RhoA; NF- $\kappa$ B; p65 serine 536; BMP2; bone morphogenetic protein 2; valve interstitial cells; mineralization; calcification; osteogenic program

## Résumé

### **L'acide lysophosphatidique provenant de l'oxydation des LDL entraine la progression de la maladie valvulaire aortique calcifiée via LPAR-1 et l'activation de la voie RhoA-NF-kB**

**Introduction:** Le rétrécissement aortique calcifié (RAC), la maladie valvulaire la plus fréquente, est caractérisé par une minéralisation progressive de la valve. Des études récentes de randomisation Mendélienne ont révélé une relation causale entre les lipoprotéines de basse densité (LDL) et la lipoprotéine(a) avec le RAC. Cependant, le mécanisme par lequel les LDL oxydées (OxLDLs) entraînent la calcification des CIVs reste inconnu. Les OxLDL transportent les phospholipides oxydés (OxPLs) avec une teneur élevée en lysophosphatidylcholine (LPC). Récemment, nous avons démontré que l'enzyme autotaxine (ATX) sécrété par les CIVs transforme la LPC en LPA, lequel intervient dans la minéralisation de la VA. L'objectif de ce travail était : (1) d'étudier les voies de signalisations par lesquelles OxLDL-LPA favorisent la minéralisation des CIVs, et (2) d'évaluer si l'administration *in vivo* de Ki16425, un inhibiteur pharmacologique de Lpar 1-3, peut ralentir la progression du RAC chez les souris transgéniques LDLR<sup>-/-</sup>/ApoB<sup>100/100</sup>/IGFII (IGFII).

**Méthodes :** Nous avons documenté l'expression de LPAR-1 dans les VA saines et les VA calcifiées. Par l'analyse de l'activité de promoteur et la mesure des transcrits cibles par q-PCR nous avons examiné *in vitro* les mécanismes par lesquels le LPA favorise l'inflammation et la minéralisation de la VA. Nos études *in vitro* ont ensuite été validées dans un modèle murin de RAC.

**Résultats :** Nos résultats ont montré que les OxLDLs-LPA favorisent la minéralisation des CIVs. Cette réponse ostéogénique est médiée par le LPAR-1 qui stimule la voie inflammatoire RhoA-NF-kB. Ainsi, nous avons démontré que RhoA-NF-KB active la kinase IKK $\alpha$ , qui, à son tour, induit une phosphorylation de NF-kB-p65 sur Ser536. Cette dernière est recrutée au niveau du promoteur *BMP2* et induit une signature ostéogénique qui ne réagit pas au rétrocontrôle négatif exercé par l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ . Chez les souris

transgéniques IGFII qui développent le RAC sous une diète riche en graisse et en saccharose (HFS), l'administration de Ki16425, un bloqueur de Lpar1-3, réduit le taux de progression du RAC de 3 fois. Le Ki16425 diminue également l'activité ostéogénique mesurée avec une sonde fluorescente qui reconnaît l'hydroxyapatite de calcium.

**Conclusions:** Ces données ouvrent potentiellement de nouvelles perspectives thérapeutiques et suggèrent que les OxLDLs-LPA favorisent un phénotype ostéogénique dans la VA via le récepteur LPAR-1 et la signalisation RhoA-NF- $\kappa$ B/p65-pS536. Par conséquent, LPAR1 peut représenter une cible thérapeutique appropriée pour empêcher la progression du RAC.

**Mots-clés:** Le rétrécissement aortique calcifié; l'acide lysophosphatidique; OxLDL, LPAR1; RhoA; NF- $\kappa$ B; p65 serine 536; BMP2; minéralisation; CIVs; phénotype ostéogénique.

## Abstract

**Background:** Oxidatively modified lipoproteins may promote the development/progression of calcific aortic valve stenosis (CAVS). Oxidative transformation of low-density lipoprotein (OxLDL) generates lysophosphatidic acid (LPA), a lipid mediator that accumulates in mineralized aortic valves. LPA activates at least 6 different G protein-coupled receptors, which may play a role in the pathophysiology of CAVS. We hypothesized that LPA derived from OxLDL may promote a NF- $\kappa$ B signature that drives osteogenesis in the aortic valve.

**Methods and Results:** The role of OxLDL-LPA was examined in isolated valve interstitial cells (VICs) and the molecular pathway was validated in human explanted aortic valves and in a mouse model of CAVS. We found that OxLDL-LPA promoted the mineralization and osteogenic transition of VICs through LPAR1 and the activation of a RhoA-NF- $\kappa$ B pathway. Specifically, we identified that RhoA/ROCK activated I $\kappa$ B kinase alpha (IKK $\alpha$ ), which promoted the phosphorylation of p65 on serine 536 (p65 pS536). p65 pS536 was recruited to the *BMP2* promoter and directed an osteogenic program not responsive to the control exerted by the inhibitor of kappa B (I $\kappa$ B $\alpha$ ). In LDLR<sup>-/-</sup>/ApoB<sup>100/100</sup>/IGFII transgenic mice (IGFII), which develop CAVS under a high-fat and high-sucrose (HF-HS) diet the administration of Ki16425, a Lpar1 blocker, reduced by 3-fold the progression rate of CAVS and also decreased the osteogenic activity as measured with a near-infrared fluorescent probe that recognizes hydroxyapatite of calcium.

**Conclusions:** OxLDL-LPA promotes an osteogenic program in the aortic valve through a LPAR1-RhoA/ROCK- p65 pS536 pathway. LPAR1 may represent a suitable target to prevent the progression of CAVS.

**Keywords:** Calcific aortic valve stenosis; calcific aortic valve disease; lysophosphatidic acid; OxLDL, LPAR1; RhoA; NF- $\kappa$ B; p65 serine 536; BMP2; bone morphogenetic protein 2; valve interstitial cells; mineralization; calcification; osteogenic program

## Introduction

Calcific aortic valve stenosis (CAVS) is a chronic disorder characterized by a progressive mineralization of the aortic valve [1]. Despite the presence of rare osteoclast-like cells in surgically explanted mineralized aortic valves, there is a net balance towards deposition of mineral through an osteogenic process [2]. Though the disease can be diagnosed early in its course by echocardiography there is no medical treatment that can prevent or reduce the progression of CAVS. Chronic low-grade inflammation is an important feature of CAVS [3]. The nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) pathway orchestrates the inflammatory response by regulating gene expression pattern, which is cell and context dependent. Site-specific post-translation modifications of p65, the prototypical NF- $\kappa$ B subunit, define selective gene expression patterns [4-5], which may play a role during the pathogenesis of CAVS. The activity of NF- $\kappa$ B is controlled by the inhibitor of kappa B (I $\kappa$ B $\alpha$ ), which in response to p65 is expressed and is recruited to the nucleus where it complexes with p65 and negatively regulates the expression of genes [4]. The phosphorylation of p65 on serine 536 (p65 pS536) directs the expression of selected genes that are not responsive to the negative regulation exerted by I $\kappa$ B $\alpha$  [6]. Therefore, p65 pS536-target genes escape I $\kappa$ B $\alpha$ -mediated negative feedback control mechanism, which may result in sustained activation of detrimental pathways. Evidence suggests that inflammatory stimuli promote the mineralization of valve interstitial cell (VIC) cultures, but the molecular process whereby inflammation promotes an osteogenic response in the aortic valve is still ill-defined [3]. Whether key osteogenic genes such as *BMP2*, a potent morphogen that induces an osteogenic program by up-regulating *RUNX2* [7], is under the control of a p65 pS536 signature in VICs is unknown.

Oxidized lipid derivatives are potent triggers of inflammation and may thus participate to the development/progression of CAVS through a specific NF- $\kappa$ B signature. Studies using a Mendelian randomization approach have underlined that the apolipoprotein B (apoB)-containing lipoproteins, low-density lipoprotein (LDL) and Lp(a), are possibly causally related to CAVS [8-10]. The circulating level of oxidized phospholipid (OxPL), a component of oxidized LDL (OxLDL), is independently related to the progression rate of CAVS [11]. We reported that the enzymes lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-

PLA2) and autotaxin (ATX), a lysophospholipase D, are overexpressed in surgically explanted stenotic aortic valves [12-13] During the oxidation of LDL, OxPLs are converted into lysophosphatidylcholine (LysoPC) by Lp-PLA2 [14]. On the other hand, oxidation of LDL also generates significant amount of lysophosphatidic acid (LPA)[15], a bioactive lipid that accumulates in mineralized, stenotic aortic valves [13]. ATX transforms LysoPC into LPA and its activity is enriched in isolated Lp(a) fraction [13]. In this work, we hypothesized that OxLDL-derived LPA promotes the progression of CAVS through a NF- $\kappa$ B-induced osteogenic program unresponsive to the negative regulation of I $\kappa$ B $\alpha$ .

## Methods

### *Procurement of tissues for analyses*

We examined stenotic aortic valves (CAVS) that were explanted from patients at the time of aortic valve replacement. Control non- calcified aortic valves with normal echocardiographic analyses were obtained during heart transplant procedures. The protocol and experiments detailed in the method section were approved by the IUCPQ ethical committee and informed consent was obtained from the subjects. The study conforms with the declaration of Helsinki.

### *Isolation of LDL*

Low-density lipoproteins (LDL) were freshly isolated from healthy human donors (lipid profile in Table 6.2) by sequential ultracentrifugation.

### *VIC isolation and culture*

VICs were isolated and purity of the cell preparation was confirmed as previously described [16]. Cells were used between passage 4-7 and were incubated for 7 days with a mineralizing medium (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM) as previously described [17].

### *Real-time polymerase chain reaction*

Total RNA was isolated with RNeasy micro kit from Qiagen (ON, Canada). One  $\mu$ g of RNA was reverse transcribed using the Quantitec Reverse Transcription Kit from Qiagen. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed with Quantitec SYBR Green PCR kit from Qiagen on the Rotor-Gene 6000 system (Corbett Robotics Inc, CA, USA).

### ***Luciferase reporter assay***

COS7 cells were transfected with the PathDetect NF- $\kappa$ B cis Reporting System (Agilent, CA, USA) or BMP2 promoter (Addgene, MA, USA) fused to firefly luciferase gene along with a vector encoding for the renilla luciferase (Promega, WI, USA) as a reporter for transfection efficiency.

### ***Immunofluorescence on cells***

Incubation with antibodies against LPAR1 (Novus Biologicals, ON, Canada) was performed in PBS1X containing 1% milk overnight at 4°C. Cells were incubated one hour with alexa568-conjugated secondary antibodies and with alexa488-conjugated phalloidin (Molecular Probes/ThermoFisher Scientific, ON, Canada). Confocal images were acquired using a Zeiss microscope Axio Observer Z1, LSM800 driven by the Zen software (Objective 40X oil, 1.4 NA, Zeiss, ON, Canada).

### ***Quantitative chromatin immunoprecipitation***

Cells were treated for 6 hours with LPA and were then cross-linked in 1% formaldehyde solution (Sigma, ON, Canada) for 15 minutes at room temperature. Cells were washed twice with PBS1X and harvested in 1 ml of PBS1X containing protease inhibitor cocktail (PIC) (Sigma, ON, Canada). Following centrifugation, pellets were resuspended and sonicated to shear the DNA to an average length of 200 to 800 base pairs. Antibodies against p65 (BioVision, CA, USA) or p65 phosphoS536 or non-relevant rabbit IgG (Cell Signaling Technology, MA, USA) antibodies were incubated with proteins G dynabeads (Life technologies, ON, Canada). Samples were washed first with low salt wash buffer, then with high salt wash buffer, followed with LiCl wash buffer and finally with TE buffer at 4°C. The complex was then eluted from dynabeads by adding 210  $\mu$ l of elution buffer at 65 °C for one hour. The eluted samples were reverse cross-linked by adding 8  $\mu$ L of 5M NaCl and incubated at 65°C overnight. DNA fragments were purified by using phenol-chloroform and samples were analyzed by qPCR.

### ***Animals***

All animal protocols were conducted according to guidelines set out by the Laval University Animal Care and Handling Committee and are conform with the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals. Male LDLR<sup>-/-</sup> /ApoB<sup>100/100</sup> /IGF2 (on C57BI/6J background) (established colony) were housed in a pathogen-free, temperature-controlled

environment under a 12:12 hour light-dark cycle and fed *ad libitum* of a high fat, high sucrose, cholesterol diet (55% calories from fat, 28% from sucrose, 0.2% cholesterol) for 9 months starting at 12 weeks of age. At the end of protocol, mice were sacrificed by anesthesia under isoflurane (2-3% inhalation) and cardiac puncture, which was performed by a qualified technician.

### ***Echocardiography in mice***

Transthoracic echocardiography was performed under 2.5% isoflurane anaesthesia, with a L15-7io (5-12 Megahertz) and S12-4 (4-12 Megahertz) probes connected to a Philips HD11XE ultrasound system (Philips Healthcare Ultrasound, Netherlands).

### ***Statistical analyses***

Continuous data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Continuous data were tested for normality of distribution with the Shapiro-Wilk test and compared with Student t-test. For continuous data with a non-normal distribution or with a  $n \leq 10$  the values were compared between groups with nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test when two or more than two groups were compared respectively. Post-hoc Steel-Dwass multiple comparisons test were performed when the p value of the Kruskal-Wallis test was  $< 0.05$ . Categorical data were expressed as percentage and compared with Fischer's exact test. For *in vitro* experiments with VICs, n represents the number of experiment performed with different donors. A p-value  $< 0.05$  was considered significant. Statistical analysis was performed with a commercially available software package JMP 12.0 or Prism 6.0.

## **Results**

### **OxLDL-induced osteogenic program in VICs is mediated by lysophosphatidic acid**

Human valve interstitial cells (VICs) were obtained from non-mineralized aortic valves (heart transplantation) (Table 6-2) and treated with a mineralizing medium for 7 days [18]. VIC cultures treated with OxLDL increased the deposition of calcium, which was determined by the Arsenazo III method, by 2.7-fold (Figure 1A). However, the addition of Ki16425, an inhibitor of LPA receptor 1 (LPAR1/Edg-2) and LPAR3/Edg-7, to the growth medium of VIC cultures prevented OxLDL-induced mineralization (Figure 1A). These data suggested that LPA produced by OxLDL promoted the mineralization of VICs. We next assessed the effect of LPA (10 $\mu$ M) with different acyl chain length and saturation on

the mineralization of VICs. We found that the level of mineralization increased with the acyl chain length and with non-saturated species (Figure 1B). For the next series of experiments, we used LPA18:1 as it is present in different bodily fluids. Different doses of LPA were used in mineralization assay with VICs. We observed that mineralization of VIC cultures increased and plateaued between 1 $\mu$ M and 5  $\mu$ M of LPA, whereas a dose of 10 $\mu$ M was more potent (Figure 1C). Since the level of LPA in different tissues is in the low micromolar range, we next used 10 $\mu$ M of LPA18:1 for follow-up experiments [19]. To examine whether LPA promoted the mineralization of VIC cultures through an osteogenic process we measured the levels of bone-related markers in cells treated for 7 days with LPA. VICs treated with LPA had higher level of transcripts encoding osteogenic markers *RUNX2*, *BGLAP*, *COL1A1* and *BMP2* (Figures 1D-G). Also, the activity of alkaline phosphatase (ALP), an osteogenic marker, increased by 1.8-fold following a treatment with LPA for 7 days (Figure 1H). Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) is a potent morphogen involved in osteogenic differentiation. By using noggin, a natural inhibitor of BMPs, we observed that LPA-induced mineralization of VIC cultures was abrogated (Figure 1I). Small interfering RNA for *BMP2* reduced significantly the mRNA and protein levels of the target (Suppl. Figure 1A-B) and prevented LPA-induced mineralization of VICs (Figure 1J).

#### ***Lysophosphatidic acid induces an osteogenic program in VICs through LPAR1***

Considering that OxLDL-mediated mineralization was abrogated by Ki16425, an inhibitor of LPAR1 and LPAR3, we next assessed the gene expression profile of *LPAR1* and *LPAR3* in VICs. We documented that mRNA encoding for *LPAR1* was robustly expressed by VICs, whereas *LPAR3* was not detected (Figure 2A). Examination by immunofluorescence and confocal microscopy showed in isolated VICs that LPAR3 was not expressed (Suppl. Figure 2), whereas LPAR1 was expressed in both the cytosol and at the cell membrane, which was delimited by membrane-associated cortical F-actin shown with phalloidin (Figure 2B). Small interfering RNA for *LPAR1* decreased significantly the gene and protein levels of the target (Suppl. Figure 1C) and prevented OxLDL- and LPA-induced mineralization of VIC cultures (Figure 2C). A knockdown LPAR1 in VICs prevented the rise of *BMP2* mRNA measured 24 hours after a treatment with LPA (Figure 2D). Similarly, LPA-induced rise of *RUNX2*, *BGLAP* and *COL1A1* (measured at 24 hours) was abrogated

by a knockdown of LPAR1 in VICs (Figure 3E-G). We assessed the expression level of LPAR1 in human surgically explanted CAVS and control non-mineralized aortic valves obtained from heart transplantations (Table 6-3). The level of *LPAR1* mRNA was increased by 1.5-fold in human CAVS tissues when compared to control non-mineralized aortic valves (Figure 2H). Both mineralized tricuspid and bicuspid aortic valves had higher level of *LPAR1* mRNA compared to control valves (Suppl. Figure 3). By using western blotting we documented that LPAR1 was increased by 5.2-fold in human mineralized aortic valves (Figure 2I). With immunofluorescence and confocal microscope imaging, we found in mineralized, stenotic aortic valves that LPAR1 was co-expressed with vimentin, a marker of VICs (Figure 2J and Suppl. Figure 4), whereas LPAR3 was not expressed (Suppl. Figure 4). LPAR1 has been shown to potently stimulate RhoA/Rho kinase (ROCK) pathway in different cell populations [20], but whether VICs respond in a similar manner has not been explored. In isolated VICs, we found that LPA rapidly induced the activity of ROCK, which was already detected after 15 minutes of treatment (Figure 2K). The silencing of LPAR1 in VICs abrogated the activation of ROCK induced by LPA (measurements performed at 30 minutes) (Figure 2L). The inhibition of ROCK with Y27632 (Figure 2M) prevented LPA-induced mineralization of VIC cultures (Figure 2N). These data thus suggest that LPAR1 is coupled to RhoA/ROCK in promoting the mineralization of cell cultures and the osteogenic differentiation of VICs.

***Lysophosphatidic acid-mediated activation of RhoA/ROCK promotes NF- $\kappa$ B activity***

RhoA/ROCK may activate NF- $\kappa$ B to induce mineralization of VIC. To verify this hypothesis, we transfected the fibroblast cell line COS7 with a luciferase vector containing  $\kappa$ B responsive elements and we treated cell cultures with LPA. LPA activated the  $\kappa$ B responsive element at 1 hour with a maximal response at 6 hours (Figure 3A). This experiment was replicated in human VICs and showed that LPA increased after 6 hours the activity of a reporter vector containing  $\kappa$ B responsive elements (Suppl. Figure 5). In the next series of experiments, the reporter assay was thus conducted at 6 hours after stimulation with LPA. Increased  $\kappa$ B activity in reporter assay following a treatment with LPA was prevented when BAY11-7085, an inhibitor of I $\kappa$ B kinase (IKK), was added to the growth medium (Figure 3B). Also, in mineralization assay over 7 days, BAY11-7085 prevented the mineralization of VIC cultures induced by LPA (Figure 3C), indicating that

the process possibly relied on the NF- $\kappa$ B pathway. Following an inhibition of RhoA/ROCK with Y27632 we noted that LPA-induced  $\kappa$ B reporter activity was abrogated (Figure 3D). To confirm the role of RhoA in the activation of the NF- $\kappa$ B pathway we next used a vector encoding for a dominant negative RhoA mutant N19 (RhoAN19). COS7 were co-transfected with RhoAN19 and the  $\kappa$ B reporter coupled to luciferase. A co-transfection of the dominant negative RhoAN19 mutant prevented the LPA-induced activation of  $\kappa$ B reporter (Figure 3E). Also, the co-transfection of a constitutively active RhoA mutant (RhoAL63) in COS7 induced the activation of the  $\kappa$ B luciferase reporter (Figure 3F). To buttress these findings, we measured the level of *IL6* mRNA, a NF- $\kappa$ B responsive gene, following stimulation with LPA in presence or absence of Y27632, an inhibitor of RhoA/ROCK. A treatment during 24 hours with LPA in VICs resulted in a significant increase of *IL6* mRNA level (Figure 3G). The addition of Y27632 to the growth medium of VIC cultures prevented the rise of *IL6* mRNA induced by LPA (Figure 3G). LPA-induced rise of *IL6* mRNA in VICs was abrogated by a knockdown of LPAR1 (Figure 3H).

***Lysophosphatidic acid-induced expression of BMP2 is mediated by RhoA and NF- $\kappa$ B***

Given that BMP2 plays an important role in LPA-induced osteogenic reprogramming of VICs, we next evaluated whether BMP2 is activated through a RhoA-NF- $\kappa$ B pathway. A vector encoding for the promoter region of *BMP2* and coupled with the luciferase gene was transfected in COS7 cells to assess its activity in response to LPA. We observed that LPA activated the promoter region of *BMP2* with a maximal response after 6 hours (Figure 4A). This experiment was also replicated in human VICs and showed that after 6 hours LPA activated a reporter vector containing the *BMP2* promoter region (Suppl. Figure 6). After 24 hours of treatment with LPA, the level of BMP2 protein, assessed with an ELISA, was significantly increased in VIC cultures (Figure 4B). In reporter assay, LPA-induced activity of *BMP2* promoter was prevented by a co-transfection with the dominant negative RhoA mutant vector (RhoAN19) (Figure 4C). In VICs, Y27632 (inhibitor of ROCK) significantly reduced LPA-induced rise of *BMP2* transcripts measured at 24 hours (Figure 4D). The inhibition of NF- $\kappa$ B pathway with BAY11-7085 also prevented LPA-induced rise of *BMP2* mRNA at 24 hours (Figure 4E). To further show an involvement of NF- $\kappa$ B in the activation of *BMP2* we next silenced p65 with small interfering RNA. A knockdown of p65 (Suppl. Figure 7A-B) significantly reduced the level of *BMP2* transcripts measured at 24 hours

after a treatment with LPA (Figure 4F). Also, a silencing of p65 prevented the mineralization of VIC cultures induced by LPA over 7 days (Figure 4G). These data thus suggested that RhoA and p65 subunit of NF- $\kappa$ B positively regulates the expression of *BMP2* and promotes the mineralization of VIC cultures.

***Phosphorylation of serine 536 of p65 promotes an osteogenic program not responsive to the negative feedback exerted by I $\kappa$ B $\alpha$***

The human *BMP2* promoter contains two putative  $\kappa$ B consensus sites [NRE1 (-354/-344 bp) and NRE2 (-2548/-2538 bp)] (Figure 5A). To substantiate that *BMP2* is a target of NF- $\kappa$ B we performed quantitative chromatin immunoprecipitation assay (qChIP) in VICs using an antibody directed against p65. Treatment with LPA for 6 hours induced p65 recruitment to the NRE1 site of *BMP2* and also to the promoter region (-136/-126 bp) of *IL6*, which was used as a positive control (Figure 5B-C). Attempt to perform qChIP for the distal (-2548/-2538 bp)  $\kappa$ B site (NRE2) in *BMP2* promoter region was unsuccessful owing to its high CG content. I $\kappa$ B $\alpha$  negatively regulates the expression of genes following activation of NF- $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\alpha$  is induced by p65 and shuttles between the cytosol and the nucleus where it exerts a negative control over the binding of p65 to gene promoters. However, some gene promoters (e.g. *IL8*) that bind to p65 when phosphorylated on serine 536 (p65 pS536) are not sensitive to the negative regulation induced by I $\kappa$ B $\alpha$  [4]. In order to examine whether *BMP2* is not sensitive to the negative regulation of I $\kappa$ B $\alpha$  we used the fungal-derived toxin leptomycin B, which inhibits the nuclear export and increases the level of I $\kappa$ B $\alpha$  in the nucleus of cells [4]. To verify the efficacy of leptomycine B we performed western blotting for I $\kappa$ B $\alpha$  following cell fractionation. Nuclear fraction of VICs was positive for the nuclear histone H3 and negative for the cytosolic marker Golgin-97, indicating an adequate cell fractionation (Figure 5D). The treatment with leptomycine B increased nuclear level of I $\kappa$ B $\alpha$ , whereas it decreased the cytosolic content of I $\kappa$ B $\alpha$  (Figure 5D and E). VICs were next treated with LPA with or without leptomycin B for 24 hours and *IL6*, *IL8* and *BMP2* mRNAs were measured. Leptomycine B prevented LPA-induced rise of *IL6* (Figure 5F), a gene known to be sensitive to I $\kappa$ B $\alpha$  [4]. However, leptomycin B did not affect LPA-induced expression of *IL8* and *BMP2* (Figure 5G-H). To further corroborate this finding we treated VICs with a mutant I $\kappa$ B $\alpha$  SS32-36AA vector, which cannot be phosphorylated and is thus acting as a super repressor. Similarly to leptomycine

B the mutant I $\kappa$ B super repressor did not impact on LPA-induced expression of *BMP2* and *IL8*, whereas it prevented the rise of *IL6* mRNA (Figures 5I-K). In addition, transfection of VICs with I $\kappa$ B super repressor did not prevent LPA-induced mineralization of cell cultures (Figure 5L). Taken together, these data suggested that LPA-induced activation of *BMP2* expression relies possibly on p65 pS536. In reporter assay for the *BMP2* promoter, a transfection of COS7 cells with a vector encoding for a dominant negative p65 S536A, which cannot be phosphorylated on serine 536, abrogated LPA-induced *BMP2* promoter activity (Figure 6A). Also, we found that the transfection of a dominant negative p65 S536A vector in VICs reduced significantly the mineralization of cell cultures induced by LPA after 7 days (Figure 6B). Conversely, the transfection of a vector encoding for a phosphomimetic of serine 536 p65 (p65 S536E) increased the mineralization of VIC cultures by 1.9-fold, whereas the transfection of vector encoding for wild-type p65 did not modify the level of mineral in cell cultures (Figure 6C). In qChIP assay, we found that following a treatment of VICs with LPA for 6 hours, p65 pS536 is recruited to the *BMP2* promoter whereas it is not recruited to the promoter region of *IL6* (Figure 6D-E). These data suggested that LPAR1 is coupled to RhoA in activating p65 pS536, which is recruited to the *BMP2* promoter. To verify this hypothesis, we measured by western blotting the level of p65 pS536 in response to LPA. Time-course experiments using VICs revealed that LPA rapidly activated the phosphorylation of serine 536 on p65 with a sustained response, which gradually increased from 15 to 60 minutes (Figure 6F). Inhibition of ROCK with Y27632 negated LPA-induced phosphorylation of p65 S536 (Figure 6G). In human aortic valves, we found by western blotting that the p65 pS536/p65 ratio was increased by 4.6-fold in CAVS compared to control non-mineralized aortic valves (Figure 6H). IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  are known to act downstream of RhoA/ROCK in phosphorylating p65 [21]. We thus silenced IKK $\alpha$  or IKK $\beta$  (Suppl. Figure 8A-D) and we documented the level of p65 pS536 in response to LPA in VICs. The knockdown of IKK $\alpha$  but not of IKK $\beta$  negated LPA-induced phosphorylation of p65 on S536 (Figure 6I). In the same line, phosphorylation of IKK $\alpha$  on S176-180 was increased after LPA treatment of VICs, whereas the inhibition of ROCK with Y27632 prevented this effect (Figure 6J). These data thus indicate that LPA-mediated activation of RhoA/ROCK entrains the activity of IKK $\alpha$  whereby p65 is

phosphorylated on S536 and promotes the expression of BMP2, which directs an osteogenic response in VICs.

***Inhibition of Lpar1 slows the progression of CAVS in a mouse model***

LDLR<sup>-/-</sup>/ApoB<sup>100/100</sup>/IGFII transgenic mice (IGFII) under a high-fat and high-sucrose (HF-HS) diet develop CAVS [22]. Compared to C57BL/6 mice (same background of IGFII mice) the serum level of LPA was increased significantly in IGFII mice under HF-HS diet for 6 months and correlated with ATX activity ( $r^2=0.79$ ,  $p=0.005$ ) and cholesterol levels ( $r^2=0.50$ ,  $p=0.02$ ) (Figure 7A-C). Similarly to human CAVS, we documented a significant rise of *Lpar1* mRNA in the aortic root (aortic valve plus aortic wall of the root) of IGFII mice when compared to control C57BL/6 mice (Figure 7D). Noteworthy, isolated mouse VICs expressed *Lpar1* but not *Lpar3* mRNAs (Suppl. Figure 9). The level of *Lpar1* mRNA was positively correlated with *Bmp2* mRNA level ( $r^2=0.97$ ,  $p<0.0001$ ) (Figure 7E). To mimic the clinical setting where patients are treated with an ongoing disease process, we next assessed whether the administration of Ki16425 (Lpar 1-3 blocker) may decrease the progression rate of CAVS in IGFII mice with an established and ongoing disease. Treatments were thus started after 6 months of HF-HS diet when the transaortic velocities were significantly increased compared to the baseline values ( $165.9\pm 2.6$  cm/s vs.  $102.9\pm 2.4$  cm/s,  $p<0.0001$ ) (Table 6-4). Mice were treated with Ki16425 (5 mg/kg/d i.p.) [23] or vehicle for the next 3 months while the HF-HS diet was maintained (Figure 7F). Transaortic velocities at 6 months were similar between the vehicle- and Ki16425-treated IGFII mice ( $163.1\pm 3.0$  cm/s vs.  $168.0\pm 4.2$  cm/s,  $p=0.35$ ). In the next three months (from 6 to 9 months), the transaortic velocities increased significantly in control IGFII mice receiving the vehicle ( $163.1\pm 3.0$  cm/s vs.  $186.4\pm 5.9$  cm/s,  $p=0.0007$  respectively at 6 and 9 months) (Figure 7G) (Table 6.4 and 6.5). In the IGFII mice receiving Ki16425, there was a non-significant rise in transaortic velocity between 6 and 9 months ( $168.0\pm 4.2$  cm/s vs.  $175.9\pm 5.7$  cm/s,  $p=0.18$  respectively at 6 and 9 months) and 5/11 (45%) mice showed a decrease or no progression of transaortic velocities during this period (Figure 7H) (Table 6.4). The delta transaortic velocity (transaortic velocity at 9 months – transaortic velocity at 6 months) was decreased by ~3-fold in IGFII mice treated with Ki16425 compared to control mice receiving the vehicle ( $+7.9\pm 5.6$  cm/s vs.  $+23.3\pm 5.1$ ,  $p=0.02$  respectively for Ki16425 and control) (Figure 7I). Also, Ki16425-treated mice showed a significant

improvement in the left ventricular fractional shortening (LVFS), whereas it was not significantly modified in the control IGFII mice receiving the vehicle (delta LVFS 9-6 months:  $+7.9\pm 2.2$  vs.  $+2.3\pm 1.5$ ,  $p=0.02$  respectively for Ki16425 and control) (Figure 7J). We next performed post-mortem examination of aortic valves to document the osteogenic activity by measuring the intensity of a near-infrared fluorescent probe that recognizes hydroxyapatite of calcium (OsteoSense 680EX). Compared to control IGFII mice receiving the vehicle, the administration of Ki16425 reduced significantly the deposition of hydroxyapatite of calcium in aortic valve leaflets (Figure 7K). The cholesterol and triglyceride levels were not affected by a treatment with Ki16425 (Table 6.6).

## Discussion

In this work, we identified LPAR1 as being involved in the osteogenic effect of OxLDL-LPA. Signalling through p65 pS536 defined an osteogenic signature in the aortic valve by promoting the expression of BMP2 (Figure 7L). Inhibition of this pathway by the blockade of Lpar1 in mice decreased the progression rate of CAVS by ~3-fold.

### *OxLDL, LPA and CAVS*

Previous work suggested that oxidative transformation of lipoproteins may play a role in CAVS [24]. Circulating level of OxLDL has been associated with the fibrocalcific remodelling score of surgically explanted stenotic aortic valves.<sup>25</sup> In explanted stenotic, mineralized aortic valves, immunohistological studies have highlighted that apoB, Lp(a), OxLDL and OxPL were present in the vicinity of mineralized nodules [13,26]. Moreover, the intensity of OxLDL staining in explanted mineralized aortic valves is associated with the density of inflammatory cells and the expression of cytokines [27]. Genome-wide transcriptomic analysis has shown an enrichment of inflammatory and osteogenic genes in mineralized, stenotic aortic valves [28]. Also, the presence of dense leukocyte infiltrates, a crude marker of inflammation, in surgically explanted mineralized aortic valves is associated with the fibrocalcific remodelling score [29]. Hence, these data suggest that oxidative transformation of lipoproteins may be involved in inflammation-mediated mineralization of the aortic valve. Recently, a weighted genetic risk score for LDL was found to predict the presence of mineralized aortic valves and CAVS [8]. Also, at the genome-wide level the *LPA* gene variant rs10455872, which strongly predicts the

circulating level of Lp(a), was associated with CAVS [9]. These findings raised the possibility that apoB-containing lipoproteins are causally related to CAVS. Previous studies had highlighted that LPA was produced during the oxidation of LDL [15]. In the present work, we highlighted a novel process whereby OxLDL-derived LPA promoted the mineralization of the aortic valve through LPAR1, which was increased in mineralized aortic valves.

### ***Inflammation and osteogenic transformation of VICs***

We found that LPAR1 signalled through RhoA-p65 pS536 and BMP2. The NF- $\kappa$ B pathway exerts a complex and crucial control over inflammation. The NF- $\kappa$ B barcode hypothesis posits that in order to control the expression of large number of genes, which is cell and context dependent, the post-translational modification of NF- $\kappa$ B subunits, namely p65, determines specific programs of gene expression [30-31]. We documented that LPAR1 promoted in VICs the phosphorylation of p65 on serine 536, which triggered the expression of BMP2, a key osteogenic morphogen. We found that p65 pS536, which is not inhibited by I $\kappa$ B $\alpha$ , was increased in explanted mineralized aortic valves. In isolated VICs, p65 pS536 was recruited to the *BMP2* promoter. As p65 pS536 is not responsive to I $\kappa$ B $\alpha$  it is possible that it induces a long-lasting osteogenic effect in the aortic valve. In this regard, the mineralization of VIC cultures induced by LPA was not inhibited by the transfection of a mutant super I $\kappa$ B $\alpha$  repressor. Taken together, these data suggest that LPA derived from OxLDL promotes a NF- $\kappa$ B signature, which is defined by p65 pS536, and promotes an osteogenic program in VICs.

### ***Progression of CAVS and translational implications***

Presently, the treatment of CAVS relies on the replacement of the aortic valve, which can be performed by surgical or catheter-based therapy, in patients with severe, symptomatic aortic stenosis. However, these interventions, often performed in elderly patients with multiple risk factors, carry a substantial morbidity/mortality risk [32]. Hence, the development of a medical therapy would likely result in lesser utilization of resources and better outcomes. From a clinical standpoint, a pharmacotherapy could be started in patients with mild and/or moderate aortic stenosis [33]. However, so far attempts to reduce the progression rate of aortic stenosis have been unsuccessful. Three successive randomized controlled trials have shown that administration of statins, which lowered efficiently LDL

cholesterol, failed to show any efficacy on the progression of aortic stenosis [34]. The failure of statins to prevent the progression of CAVS is likely multifactorial and may be linked, at least in part, to the pro-osteogenic effect of this class of drug [35-36]. Also, statins do not appreciably modify the Lp(a) level, a LDL-like particle that contains an apoB linked to apolipoprotein(a) [37]. In a murine model of CAVS, we found that circulating levels of LPA were elevated and correlated with ATX activity and cholesterol levels. Similarly to our findings in human mineralized aortic valves the level of *Lpar1* in IGFII mice aortic root (aortic valve and aortic wall) was elevated. The study in mice was carried out as to mimic the clinical setting and the *Lpar1-3* blocker Ki16425 was started after 6 months of HF-HS diet when the transaortic velocities were significantly elevated. The inhibition of *Lpar1* in IGFII mice reduced the progression rate of aortic stenosis by 3-fold as evaluated with echocardiography. Consistently, the deposition of mineral in the aortic valve was decreased significantly in mice receiving the *Lpar1-3* blocker. These data thus suggest that LPAR1 could represent a novel target in order to slow the progression of CAVS. Considering that novel pharmacological compounds are in development to inhibit LPAR1, the present findings may have significant translational impact and clinical relevance.

### ***Limitations***

There are others LPARs (e.g. LPAR4-6) whose expression and role in CAVS are unknown and warrant further investigations. The mechanistic role for *Lpar1* in mice could be further buttressed by the use of knockout mice. However, the *Lpar1* knockout mouse has a high perinatal mortality rate with cranial dysmorphism and intracranial haemorrhage.<sup>38</sup> This could be circumvented by developing conditional *Lpar1* knockout mice, which, however, would need to be crossed with genetically-modified mice that develop CAVS. Nonetheless, the present translational work contributed to highlight that a process dependent on LPAR1-p65 pS536, which is amenable to a pharmacotherapy, contributes to the progression of CAVS.

## **Conclusions**

This work underscored that OxLDL-LPA promote the progression of CAVS by activating a p65 pS536 pathway downstream of LPAR1. Pharmacological inhibition of this pathway

may hold promise for the development of novel therapeutic strategies to slow the progression of CAVS.

## **Acknowledgements**

M.J.N., M.C.B. and P.M. conceived and designed experiments. M.J.N. and M.C.B. performed experiments in isolated lipid fractions. M.L.K. and B.J.A. isolated lipoproteins. M.J.N., M.C.B., G.M., D.A., F.H. performed *in vitro* studies. R.B., K.L.Q. and A.D. performed echocardiography in mice. M.J.N., M.C.B. performed analyses in mice. M.J.N. performed reporter assays and ChIP. A. M. contributed to the production of mice. P.M. drafted the manuscript. All the authors critically reviewed the manuscript and provided scientific input.

## **Conflict of interest**

No conflict of interest.

## Reference List

- (1) Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP, Otto CM. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation* 2011;124(16):1783-91.
- (2) Nagy E, Eriksson P, Yousry M, Caidahl K, Ingelsson E, Hansson GK, Franco-Cereceda A, Back M. Valvular osteoclasts in calcification and aortic valve stenosis severity. *Int J Cardiol* 2013;168(3):2264-71.
- (3) Mathieu P, Bouchareb R, Boulanger MC. Innate and Adaptive Immunity in Calcific Aortic Valve Disease. *J Immunol Res* 2015;2015:851945.
- (4) Ghosh CC, Ramaswami S, Juvekar A, Vu HY, Galdieri L, Davidson D, Vancurova I. Gene-specific repression of proinflammatory cytokines in stimulated human macrophages by nuclear I $\kappa$ B $\alpha$ . *J Immunol* 2010;185(6):3685-93.
- (5) Hochrainer K, Racchumi G, Anrather J. Site-specific phosphorylation of the p65 protein subunit mediates selective gene expression by differential NF- $\kappa$ B and RNA polymerase II promoter recruitment. *J Biol Chem* 2013;288(1):285-93.
- (6) Sasaki CY, Barberi TJ, Ghosh P, Longo DL. Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I $\kappa$ B $\alpha$ -independent NF- $\kappa$ B pathway. *J Biol Chem* 2005;280(41):34538-47.
- (7) Jang WG, Kim EJ, Kim DK, Ryoo HM, Lee KB, Kim SH, Choi HS, Koh JT. BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription. *J Biol Chem* 2012;287(2):905-15.
- (8) Smith JG, Luk K, Schulz CA, Engert JC, Do R, Hindy G, Rukh G, Dufresne L, Almgren P, Owens DS, Harris TB, Peloso GM, Kerr KF, Wong Q, Smith AV,

- Budoff MJ, Rotter JJ, Cupples LA, Rich S, Kathiresan S, Orho-Melander M, Gudnason V, O'Donnell CJ, Post WS, Thanassoulis G. Association of low-density lipoprotein cholesterol-related genetic variants with aortic valve calcium and incident aortic stenosis. *JAMA* 2014;312(17):1764-71.
- (9) Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, Kerr KF, Pechlivanis S, Budoff MJ, Harris TB, Malhotra R, O'Brien KD, Kamstrup PR, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Allison MA, Aspelund T, Criqui MH, Heckbert SR, Hwang SJ, Liu Y, Sjogren M, van der Pals J, Kalsch H, Muhleisen TW, Nothen MM, Cupples LA, Caslake M, Di AE, Danesh J, Rotter JJ, Sigurdsson S, Wong Q, Erbel R, Kathiresan S, Melander O, Gudnason V, O'Donnell CJ, Post WS. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med* 2013;368(6):503-12.
- (10) Arsenault BJ, Boekholdt SM, Dube MP, Rheume E, Wareham NJ, Khaw KT, Sandhu MS, Tardif JC. Lipoprotein(a) levels, genotype, and incident aortic valve stenosis: a prospective Mendelian randomization study and replication in a case-control cohort. *Circ Cardiovasc Genet* 2014;7(3):304-10.
- (11) Capoulade R, Chan KL, Yeang C, Mathieu P, Bosse Y, Dumesnil JG, Tam JW, Teo KK, Mahmut A, Yang X, Witztum JL, Arsenault BJ, Despres JP, Pibarot P, Tsimikas S. Oxidized Phospholipids, Lipoprotein(a), and Progression of Calcific Aortic Valve Stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2015;66(11):1236-46.
- (12) Mahmut A, Boulanger MC, El Hussein D, Fournier D, Bouchareb R, Despres JP, Pibarot P, Bosse Y, Mathieu P. Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in calcific aortic valve disease: implications for valve mineralization. *J Am Coll Cardiol* 2014;63(5):460-9.
- (13) Bouchareb R, Mahmut A, Nsaibia MJ, Boulanger MC, Dahou A, Lepine JL, Laflamme MH, Hadji F, Couture C, Trahan S, Page S, Bosse Y, Pibarot P, Scipione CA, Romagnuolo R, Koschinsky ML, Arsenault BJ, Marette A, Mathieu P. Autotaxin Derived From Lipoprotein(a) and Valve Interstitial Cells Promotes

- Inflammation and Mineralization of the Aortic Valve. *Circulation* 2015;132(8):677-90.
- (14) Macphee CH, Moores KE, Boyd HF, Dhanak D, Ife RJ, Leach CA, Leake DS, Milliner KJ, Patterson RA, Suckling KE, Tew DG, Hickey DM. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J* 1999;338 ( Pt 2):479-87.
- (15) Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, Bittman R, Tigyi G, Aepfelbacher M. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(12):6931-6.
- (16) Bouchareb R, Cote N, Marie CB, Le QK, El Husseini D, Asselin J, Hadji F, Lachance D, Shayhidin EE, Mahmut A, Pibarot P, Bosse Y, Messaddeq Y, Boudreau D, Marette A, Mathieu P. Carbonic anhydrase XII in valve interstitial cells promotes the regression of calcific aortic valve stenosis. *J Mol Cell Cardiol* 2015;82:104-15.
- (17) Hadji F, Boulanger MC, Guay SP, Gaudreault N, Amellah S, Mkannez G, Bouchareb R, Marchand JT, Nsaibia MJ, Guauque-Olarte S, Pibarot P, Bouchard L, Bosse Y, Mathieu P. Altered DNA Methylation of Long Noncoding RNA H19 in Calcific Aortic Valve Disease Promotes Mineralization by Silencing NOTCH1. *Circulation* 2016;134(23):1848-62.
- (18) Mahmut A, Boulanger MC, Bouchareb R, Hadji F, Mathieu P. Adenosine derived from ecto-nucleotidases in calcific aortic valve disease promotes mineralization through A2a adenosine receptor. *Cardiovasc Res* 2015;106(1):109-20.
- (19) Baker DL, Desiderio DM, Miller DD, Tolley B, Tigyi GJ. Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 2001;292(2):287-95.

- (20) Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res* 2014;55(7):1192-214.
- (21) Cui R, Tieu B, Recinos A, Tilton RG, Brasier AR. RhoA mediates angiotensin II-induced phospho-Ser536 nuclear factor kappaB/RelA subunit exchange on the interleukin-6 promoter in VSMCs. *Circ Res* 2006;99(7):723-30.
- (22) Le Quang K, Bouchareb R, Lachance D, Laplante MA, El Husseini D, Boulanger MC, Fournier D, Fang XP, Avramoglu RK, Pibarot P, Deshaies Y, Sweeney G, Mathieu P, Marette A. Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(10):2283-91.
- (23) Zhou Z, Subramanian P, Sevilmis G, Globke B, Soehnlein O, Karshovska E, Megens R, Heyll K, Chun J, Saulnier-Blache JS, Reinholz M, van ZM, Weber C, Schober A. Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab* 2011;13(5):592-600.
- (24) Mathieu P, Boulanger MC. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease. *Can J Cardiol* 2014;30(9):982-93.
- (25) Cote C, Pibarot P, Despres JP, Mohty D, Cartier A, Arsenault BJ, Couture C, Mathieu P. Association between circulating oxidised low-density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis. *Heart* 2008;94(9):1175-80.
- (26) O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(4):523-32.
- (27) Mohty D, Pibarot P, Despres JP, Cote C, Arsenault B, Cartier A, Cosnay P, Couture C, Mathieu P. Association between plasma LDL particle size, valvular

- accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(1):187-93.
- (28) Bosse Y, Miqdad A, Fournier D, Pepin A, Pibarot P, Mathieu P. Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. *Circ Cardiovasc Genet* 2009;2(5):489-98.
- (29) Cote N, Mahmut A, Bosse Y, Couture C, Page S, Trahan S, Boulanger MC, Fournier D, Pibarot P, Mathieu P. Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease. *Inflammation* 2013;36(3):573-81.
- (30) Moreno R, Sobotzik JM, Schultz C, Schmitz ML. Specification of the NF-kappaB transcriptional response by p65 phosphorylation and TNF-induced nuclear translocation of IKK epsilon. *Nucleic Acids Res* 2010;38(18):6029-44.
- (31) Peng Y, Kim JM, Park HS, Yang A, Islam C, Lakatta EG, Lin L. AGE-RAGE signal generates a specific NF-kappaB RelA "barcode" that directs collagen I expression. *Sci Rep* 2016;6:18822.
- (32) Leon MB, Smith CR, Mack MJ, Makkar RR, Svensson LG, Kodali SK, Thourani VH, Tuzcu EM, Miller DC, Herrmann HC, Doshi D, Cohen DJ, Pichard AD, Kapadia S, Dewey T, Babaliaros V, Szeto WY, Williams MR, Kereiakes D, Zajarias A, Greason KL, Whisenant BK, Hodson RW, Moses JW, Trento A, Brown DL, Fearon WF, Pibarot P, Hahn RT, Jaber WA, Anderson WN, Alu MC, Webb JG. Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement in Intermediate-Risk Patients. *N Engl J Med* 2016;374(17):1609-20.
- (33) Mathieu P, Boulanger MC, Bouchareb R. Molecular biology of calcific aortic valve disease: towards new pharmacological therapies. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2014;12(7):851-62.

- (34) Teo KK, Corsi DJ, Tam JW, Dumesnil JG, Chan KL. Lipid lowering on progression of mild to moderate aortic stenosis: meta-analysis of the randomized placebo-controlled clinical trials on 2344 patients. *Can J Cardiol* 2011;27(6):800-8.
- (35) Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999;286(5446):1946-9.
- (36) Monzack EL, Masters KS. A time course investigation of the statin paradox among valvular interstitial cell phenotypes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;303(7):H903-H909.
- (37) Khera AV, Everett BM, Caulfield MP, Hantash FM, Wohlgenuth J, Ridker PM, Mora S. Lipoprotein(a) concentrations, rosuvastatin therapy, and residual vascular risk: an analysis from the JUPITER Trial (Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin). *Circulation* 2014;129(6):635-42.
- (38) Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(24):13384-9.

## Tables

	Control valves (n = 24)
Age	50 ± 2
Male (%)	82
Smoking (%)	3
Hypertension (%)	45
Diabetes (%)	4
Coronary heart disease (%)	5
Bicuspid aortic valves (%)	0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26 ± 1
Waist circumference (cm)	104 ± 5
Statins (%)	60
Beta blockers (%)	86
Calcium channel blockers (%)	5
Diuretics (%)	72
Triglycerides (mmol/L)	1.70 ± 0.21
LDL (mmol/L)	2.05 ± 0.24
HDL (mmol/L)	1 ± 0.3
Creatinine (µmol/L)	119 ± 8.5
Creatinine clearance (ml/min)	70.03 ± 5.2

**Table 6-1:** Clinical characteristics of patients for cell cultures. **Legend:** Values are mean±SEM or %; BMI: body mass index; LDL: low-density lipoprotein cholesterol; HDL: high-density lipoprotein cholesterol; and SEM, standard error of the mean.

<b>Human donors (n = 4)</b>	
Triglycerides (mmol/L)	1.22 ± 0.2
Total cholesterol (mmol/L)	4.94 ± 0.1
HDL (mmol/L)	1.94 ± 0.4
LDL (mmol/L)	2.7 ± 0.4

**Table 6-2:** Clinical characteristics of patients for LDL donors. **Legend:** Values are mean±SEM or %; LDL: low-density lipoprotein cholesterol; HDL: high-density lipoprotein cholesterol; SEM: standard error of the mean.

	Control valves (n = 31)	CAVD(n=40)	p-value
Age	51 ± 2	70 ± 2	<0.0001
Male (%)	69	48	0.095
Smoking (%)	7	5	1.00
Hypertension (%)	42	75	0.007
Diabetes (%)	13	30	0.15
Coronary heart disease (%)	50	38	0.41
Bicuspid aortic valves (%)	0	40	<0.0001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27 ± 1	29 ± 1	0.11
Waist circumference (cm)	96 ± 5	102 ± 2	0.38
Statins (%)	100	97	1.00
Beta blockers (%)	74	50	0.06
Calcium channel blockers (%)	4	21	0.06
Diuretics (%)	85	40	0.005
Aortic valve area (cm <sup>2</sup> )	--	0.73 ± 0.04	--
Aortic peak gradient (mmHg)	--	74 ± 5	--
Aortic mean gradient (mmHg)	--	46	--
Triglycerides (mmol/L)	1.40 ± 0.10	1.50 ± 0.10	0.55
LDL (mmol/L)	2.25 ± 0.15	2.07 ± 0.15	0.40
HDL (mmol/L)	1.27 ± 0.13	1.35 ± 0.06	0.57
Creatinine (µmol/L)	104.60 ± 6.70	88.40 ± 3.80	0.04
Creatinine clearance (ml/min)	71.40 ± 5.10	73.60 ± 3.70	0.72

**Table 6-3:** Clinical characteristics of patients for qPCR analysis. **Legend:** Values are mean±SEM or %; P values: Student t test or Fisher exact test; BMI: body mass index; LDL: low-density lipoprotein cholesterol; HDL: high-density lipoprotein cholesterol; and SEM, standard error of the mean.

	<b>Baseline (n=23)</b>	<b>6 months ( n=23)</b>	<b>p-value</b>
<b>Mice weight (g)</b>	35±1	51±2	<0.0001
<b>LV systolic function</b>			
<b>FS (%)</b>	45±2	30±1	<0.0001
<b>EF (%)</b>	82±2	63±2	<0.0001
<b>SV (ml)</b>	0.06±0.01	0.05±0.03	0.006
<b>Heart rate (bpm)</b>	394±18	485±7	<0.0001
<b>CO (ml/min)</b>	25±1	25±2	0.60
<b>LV diastolic function</b>			
<b>E/E'</b>	28.6±1.5	35.2±1.3	0.0003
<b>Aortic Valve Hemodynamics</b>			
<b>Peak aortic jet velocity (cm/s)</b>	102.9±2.4	165.9±2.6	<0.0001
<b>Peak LVOT velocity (cm/s)</b>	83.5±2.4	123.6±3.1	<0.0001
<b>LVOT area (mm<sup>2</sup>)</b>	1.35±0.01	1.17±0.02	<0.0001
<b>AVA (mm<sup>2</sup>)</b>	1.18±0.04	0.86±0.03	<0.0001

**Table 6-4:** Echocardiographic parameters in baseline and IGFII mice. **Legend:** Values are mean±SEM or %; P values: Student t test or Fisher exact test; LV: left ventricle, FS: fractional shortening, EF: ejection fraction, SV: stroke volume, CO: cardiac output, E/E': mitral inflow, LVOT: left ventricular outflow tract, AVA: aortic valve area, and SEM, standard error of the mean.

	IGFII Diluent (n=12)			IGFII Ki16425 (n=11)		
	6 months	9 months	P	6 months	9 months	P
<b>Mice weight (g)</b>	51±2	43±5	0.45	53±2	44±6	0.48
<b>LV systolic function</b>						
FS (%)	31.3±1.3	34±1.3	0.16	28±1.7	36±1.4	0.006
EF (%)	66±2	69±2	0.15	62±3	72±2	0.006
SV (ml)	0.06±0.04	0.05±0.03	0.32	0.05±0.01	0.05±0.01	0.97
Heart rate (bpm)	492±10	460±36	0.31	478 ±10	504±14	0.13
CO (ml/min)	28±2	25±1	0.31	21±3	25±1	0.31
<b>LV diastolic function</b>						
E/E'	34.7±1.4	39.6±2.5	0.15	35.8±2.2	36.8±2.6	0.64
<b>Aortic Valve Hemodynamics</b>						
Peak aortic jet velocity (cm/s)	163.1±3.0	186.4±5.9	0.0007	168.0±4.2	175.9±5.7	0.18
Peak LVOT velocity (cm/s)	119.0±3.5	139.5±2.5	0.0006	128.1±4.5	134.3±5.2	0.13
LVOT area (mm <sup>2</sup> )	1.22±0.02	1.10±0.03	0.014	1.14±0.02	1.13±0.04	0.92
AVA (mm <sup>2</sup> )	0.90±0.03	0.75±0.05	0.02	0.83±0.05	0.81±0.06	0.85

**Table 6-5:** Echocardiographic parameters in IGFII mice. **Legend:** Values are mean±SEM or %; P values: Student t test or Fisher exact test; LV: left ventricle, FS: fractional shortening, EF: ejection fraction, SV: stroke volume, CO: cardiac output, E/E': mitral inflow, LVOT: left ventricular outflow tract, AVA: aortic valve area, and SEM, standard error of the mean.

	<b>IGFII Diluent (9 months)</b> (n=12)	<b>IGFII Ki16425 (9 months)</b> (n=11)	<b>p- value</b>
<b>Mice weight (g)</b>	43±5	44±6	0.42
<b>LV systolic function</b>			
<b>FS (%)</b>	34±1	36±1	0.18
<b>ΔLVFS</b>	1.06±1.6	6.43±2	0.02
<b>EF (%)</b>	69±2	72±2	0.18
<b>SV (ml)</b>	0.05±0.03	0.05±0.01	0.81
<b>Heart rate (bpm)</b>	460±36	504±14	0.25
<b>CO (ml/min)</b>	25±1	25±1	0.98
<b>LV diastolic function</b>			
<b>E/E'</b>	39.6±2.5	36.8±2.6	0.44
<b>Aortic Valve Hemodynamics</b>			
<b>Peak aortic jet velocity (cm/s)</b>	186.4±5.9	175.9±5.7	0.36
<b>ΔV2(cm/sec)</b>	23.33±5	7.9±5.5	0.02
<b>LVOT area (mm<sup>2</sup>)</b>	1.10±0.03	1.13±0.04	0.53
<b>AVA (mm<sup>2</sup>)</b>	0.75±0.05	0.81±0.06	0.38

**Table 6-6:** Echocardiographic parameters in IGFII mice 9 months. **Legend:** Values are mean±SEM or %; P values: Student t test or Fisher exact test; LV: left ventricle, FS: fractional shortening, EF: ejection fraction, SV: stroke volume, CO: cardiac output, E/E': mitral inflow, LVOT: left ventricular outflow tract, AVA: aortic valve area, ΔLVFS: Delta LV fractional shortening, ΔV2: Delta Peak aortic jet velocity, and SEM, standard error of the mean.

	<b>IGFII Diluent</b> <b>(9 months)</b>	<b>IGFII Ki16425</b> <b>(9 months)</b>	<b>p-value</b>
<b>Cholesterol (mmol/l)</b>	20±2	20±1	0.85
<b>Triglycerides (mmol/l)</b>	5.3±0.4	6.0±0.5	0.25

**Table 6-7:** Assessment of biological parameters in IGFII mice. **Legend:** Values are mean±SEM or %; SEM, standard error of the mean.

## Figures legends

### Figure 6-1: LPA-mediated VIC mineralization depends on BMP2

A) Treatment with Ki16425 prevents OxLDL-induced mineralization of VICs (n=6) (calcium measured after 7 days). B) VICs were treated with mineralizing medium in presence of different LPA species (n=6). C) VICs were treated with mineralizing medium in presence of increasing LPA 18:1 concentration (n=6). D-H) *RUNX2*, *BGLAP*, *COL1A1*, *BMP2* genes (n=6) and ALP activity (n=6) were increased in VICs following LPA treatment (7 days). I) Treatment with Noggin inhibits LPA-induced mineralization (n=6). J) *BMP2* siRNA abrogates LPA-induced mineralization of VICs (n=6). Values are mean  $\pm$  SEM. OxLDL: 100ng/ml, Ki16425: 10 $\mu$ M, LPA: 10 $\mu$ M, Noggin: 2.5 $\mu$ M. \* p<0.05.

### Figure 6-2: LPAR1 mediates LPA response in VICs

A) *LPAR1* expression in VICs (n=6). B) Confocal images of *LPAR1* in VICs. Scale bar 20 $\mu$ M, (n=5). C) *LPAR1* is required for OxLDL and LPA induced mineralization of VICs (n=6). D-G) si*LPAR1* prevented LPA-mediated rise of *BMP2* (D), *RUNX2* (E), *BGLAP* (F) and *COL1A1* (G) (n=6) (measurements at 24 hours). H) *LPAR1* mRNA measurement in control non-mineralized (CTL) (n=31) versus calcified aortic valves (CAVS) (n=40). I) Representative western blot and quantification of *LPAR1* in CTL (n=8) versus CAVS (n=8). J) Epifluorescence image of a calcified aortic valve showing the organisation of the tissue in DAPI, scale bar 1000 $\mu$ M and confocal images showing *LPAR1* and vimentin co-expression in the same tissue, scale bar 10 $\mu$ M, (n=6). K-M) ROCK activity measurements; kinetics following LPA treatment (n=6) (K), si*LPAR1* negated LPA response (n=6) (L) and Y27632 abrogated LPA effect (n=5) (M). N) Treatment with Y27632 reduces LPA-mediated mineralization in VICs (n=6). Values are mean  $\pm$  SEM. LPA: 10 $\mu$ M, OxLDL: 100 ng/ml, Y27632: 5 $\mu$ M; \* p<0.05.

### Figure 6-3: LPA-induced VICs mineralization relies on the NF- $\kappa$ B pathway

A-B) NF- $\kappa$ B reporter assay showing increased NF- $\kappa$ B activity in response to LPA (n=4) (A) and its inhibition by BAY11-7085 (n=6) (B). C) BAY11-7085 prevents LPA-induced mineralization (n=6). D-F) NF- $\kappa$ B reporter assay; Y27632 (n=6) (D) and RhoA N19 (n=6) (E) inhibits and RhoA L63 (n=6) (F) mimics LPA effect on NF- $\kappa$ B activity. G-H) *IL-6* mRNA measurements in response to LPA, Y27632 (n=6) (G) and si*LPAR1* (n=6) (H)

decreases LPA-induced IL-6 rise. Values are mean  $\pm$  SEM. LPA: 10 $\mu$ M, BAY11-7085: 5 $\mu$ M, Y27632: 5 $\mu$ M; \* p<0.05.

**Figure 6-4: LPA-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway promotes BMP2 expression**

A-B) LPA increases *BMP2* promoter activity (n=4) (A) and BMP2 protein level (n=6) (B). C) RhoA N19 inhibits LPA-induced *BMP2* promoter activity (n=6). D-E) Y27632 (n=6) (D) and BAY11-7085 (n=6) (E) abrogates LPA-mediated rise in *BMP2* mRNA. F-G) p65 is required for LPA regulation of *BMP2* level (n=6) (F) and mineralization (n=6) (G). Values are mean  $\pm$  SEM. LPA: 10 $\mu$ M, Y27632: 5 $\mu$ M, BAY11-7085; \* p<0.05.

**Figure 6-5: LPA-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway regulates BMP2 promoter activity**

A) Scheme depicting NRE sites localization in the *BMP2* promoter. B-C) ChIP assays; p65 binds to *BMP2* (B) and *IL6* (C) promoters in response to LPA (n=6). D-E) Western blots on nuclear and cytoplasmic fractions demonstrating the efficiency of leptomycinB (LepB) treatment (D); quantification of WB (n=4). F-H) LepB inhibits LPA-mediated rise of *IL6* (F) but not of *IL8* (G) nor *BMP2* (H) (n=6). I-K) I $\kappa$ B $\alpha$  super repressor (SS32/36AA) does not block LPA effect on *BMP2* (I) and *IL8* (J), but blocks its effect on *IL6* (K) (n=6). L) I $\kappa$ B $\alpha$  SS32/36AA has no effect on LPA-induced mineralization of VICs (n=6). Values are mean  $\pm$  SEM. LPA: 10 $\mu$ M, Leptomycin B: 20nM; \* p<0.05.

**Figure 6-6: LPA-mediated activation of BMP2 relies on phosphorylation of p65 S536**

A-C) P65 S536A inhibits LPA-mediated rise in *BMP2* promoter activity (n=6) (A) and mineralization (n=6) (B), while p65 S536E mimics the effect of LPA (n=6) (C). D-E) ChIP assays; p65 phosphoS536 binds to *BMP2* (D), but not to *IL6* (E) promoters in response to LPA (n=6). F) LPA induces p65 phosphorylation on S536 (n=4). G) Y27632 blocks LPA-induced p65 S536 phosphorylation (n=4). H) Representative western blot showing that p65 phosphoS536 is increased in CAVS (n=12) versus control (n=10) tissues. I) p65 S536 phosphorylation relies on IKK $\alpha$  (n=4). J) LPA-mediated IKK $\alpha$  phosphorylation is abrogated by Y27632 (n=6). Values are mean  $\pm$  SEM. LPA: 10 $\mu$ M; \* p<0.05.

**Figure 6-7: Role of the ATX-LPAR1 pathway in vivo**

A) LPA is increased in IGFII mice serum (n=10). B-C) LPA level correlates with blood plasma ATX activity (B) and cholesterol level (C) (n=10). D-E) *Lpar1* is elevated in IGFII

mice (D) and it correlates with *Bmp2* level (E) (n=8). F) Outline of the animal protocol. G-H) Transaortic velocities (V2) were increased in mice receiving vehicle (G) (n=12) while they were stable in mice receiving Ki16425 (H) (n=11). I)  $\Delta V2$  was significantly higher in mice receiving vehicle compared to Ki16425 (n=23). J)  $\Delta LVFS$  was significantly lower in mice receiving vehicle compared to Ki16425 (n=23). K) Hydroxyapatite was more abundant in leaflets of mice receiving vehicle compared to Ki16425 (n=13), scale bar 200 $\mu$ M. Values are mean  $\pm$  SEM. Ki16425: 5mg/kg/day.

# Figures

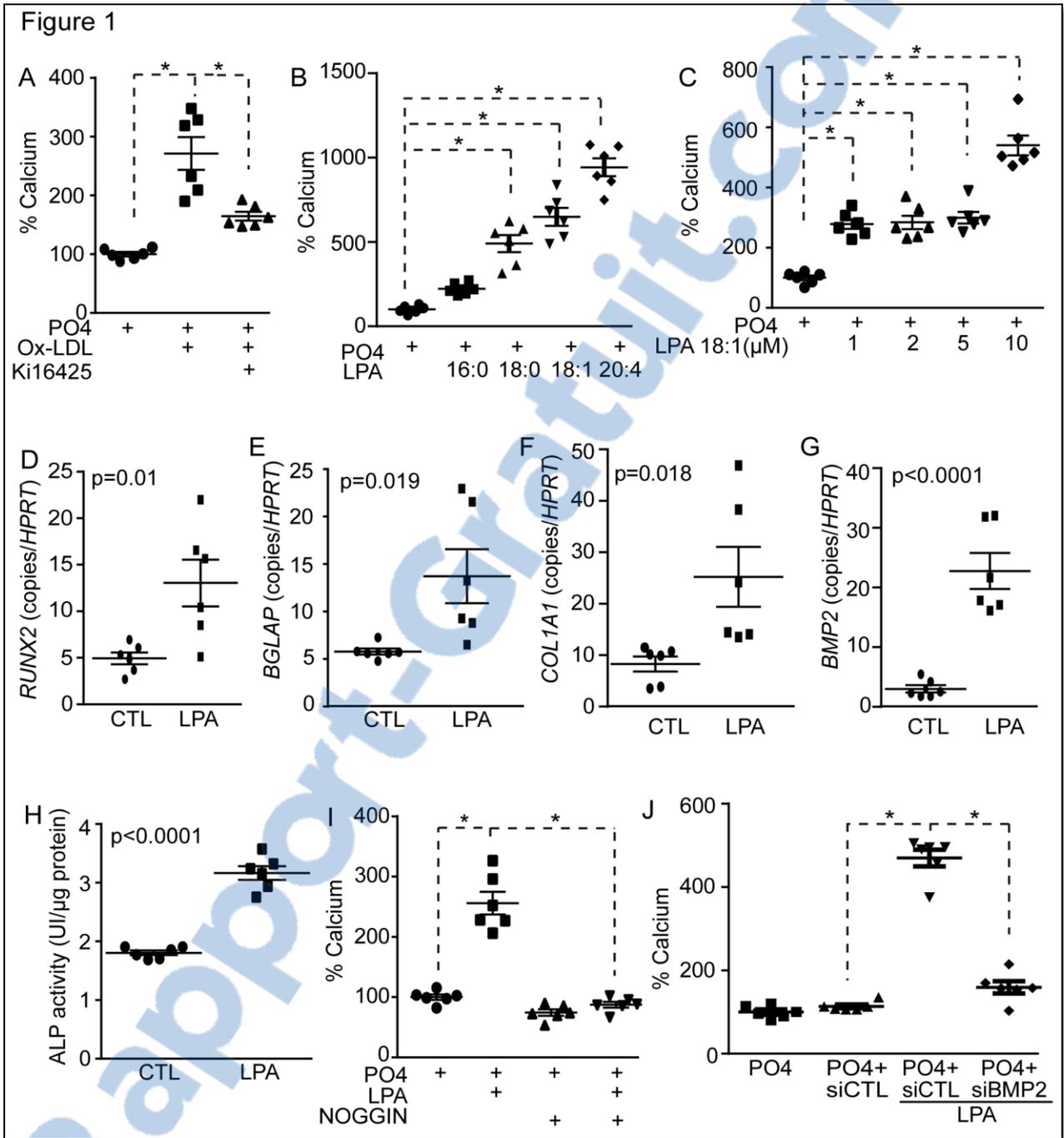


Figure 2

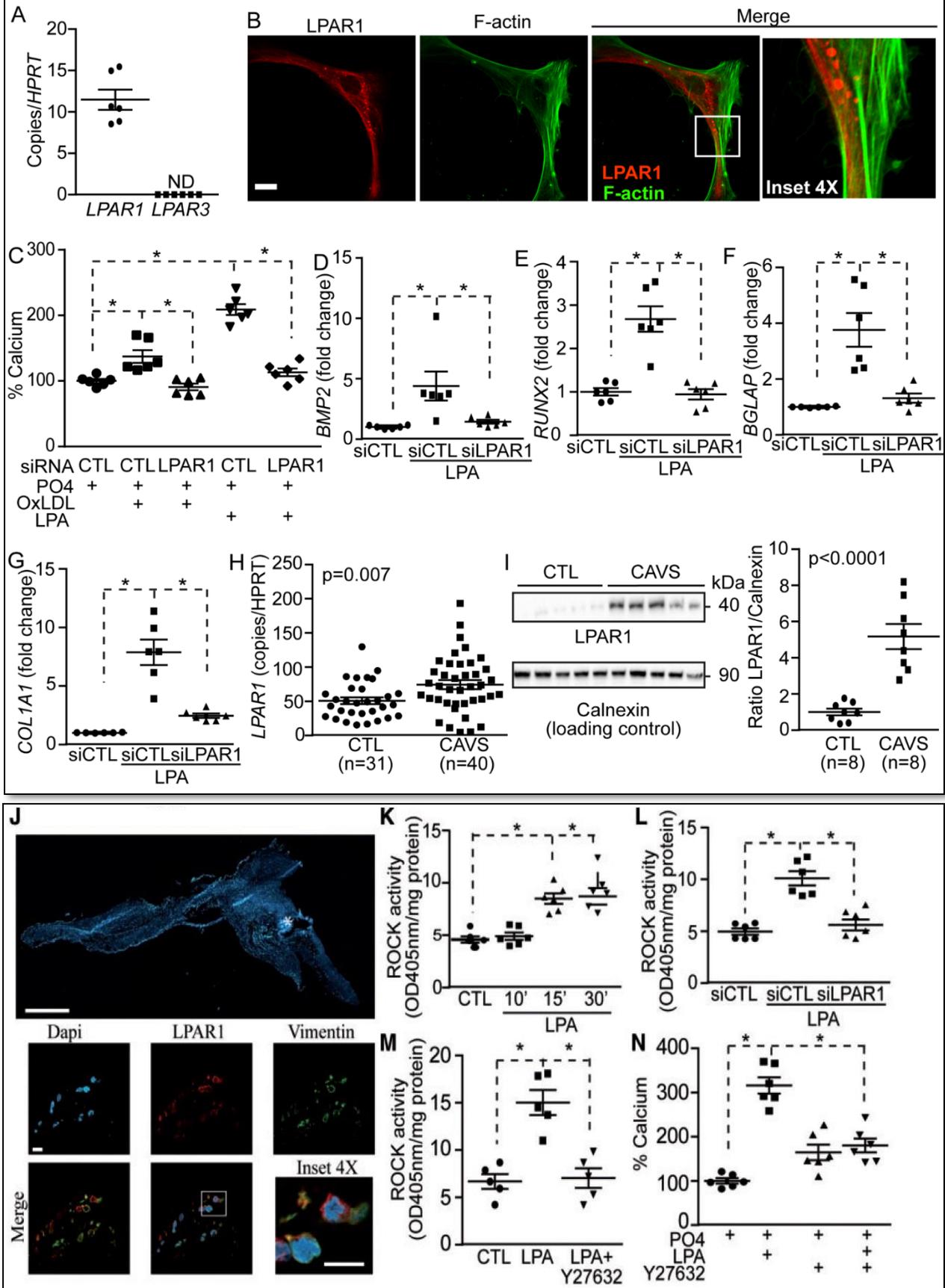


Figure 3

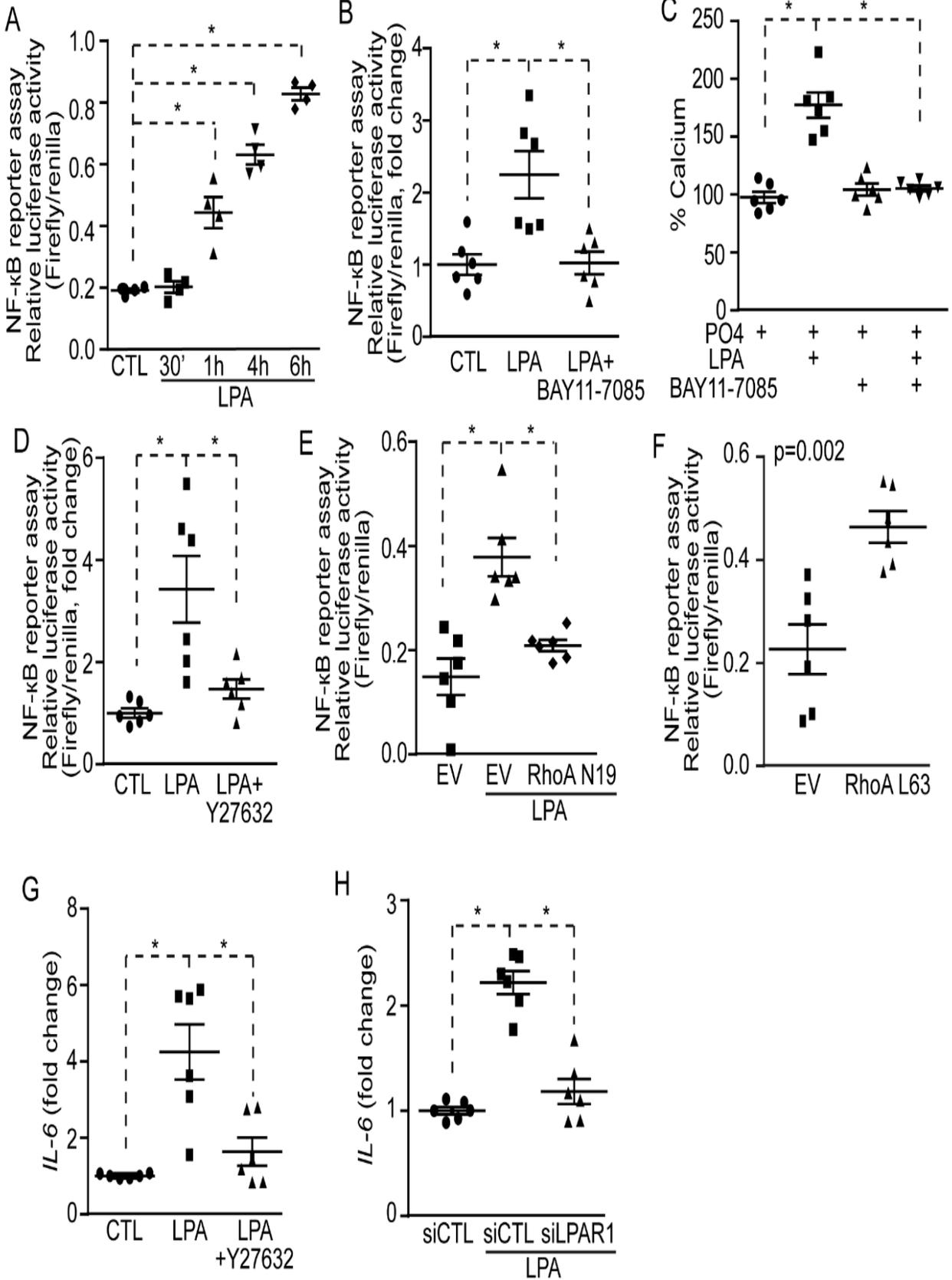


Figure 4

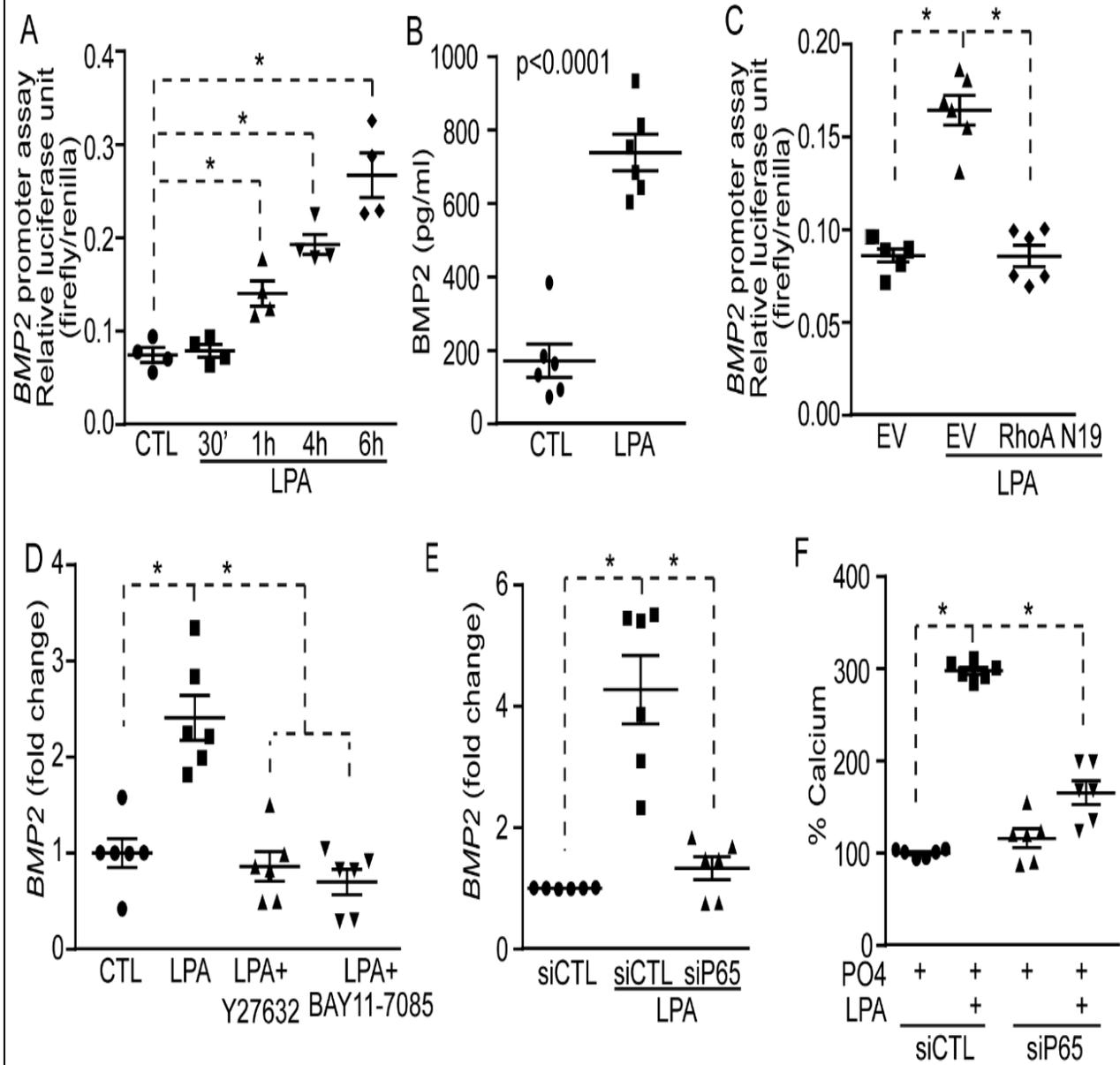


Figure 5

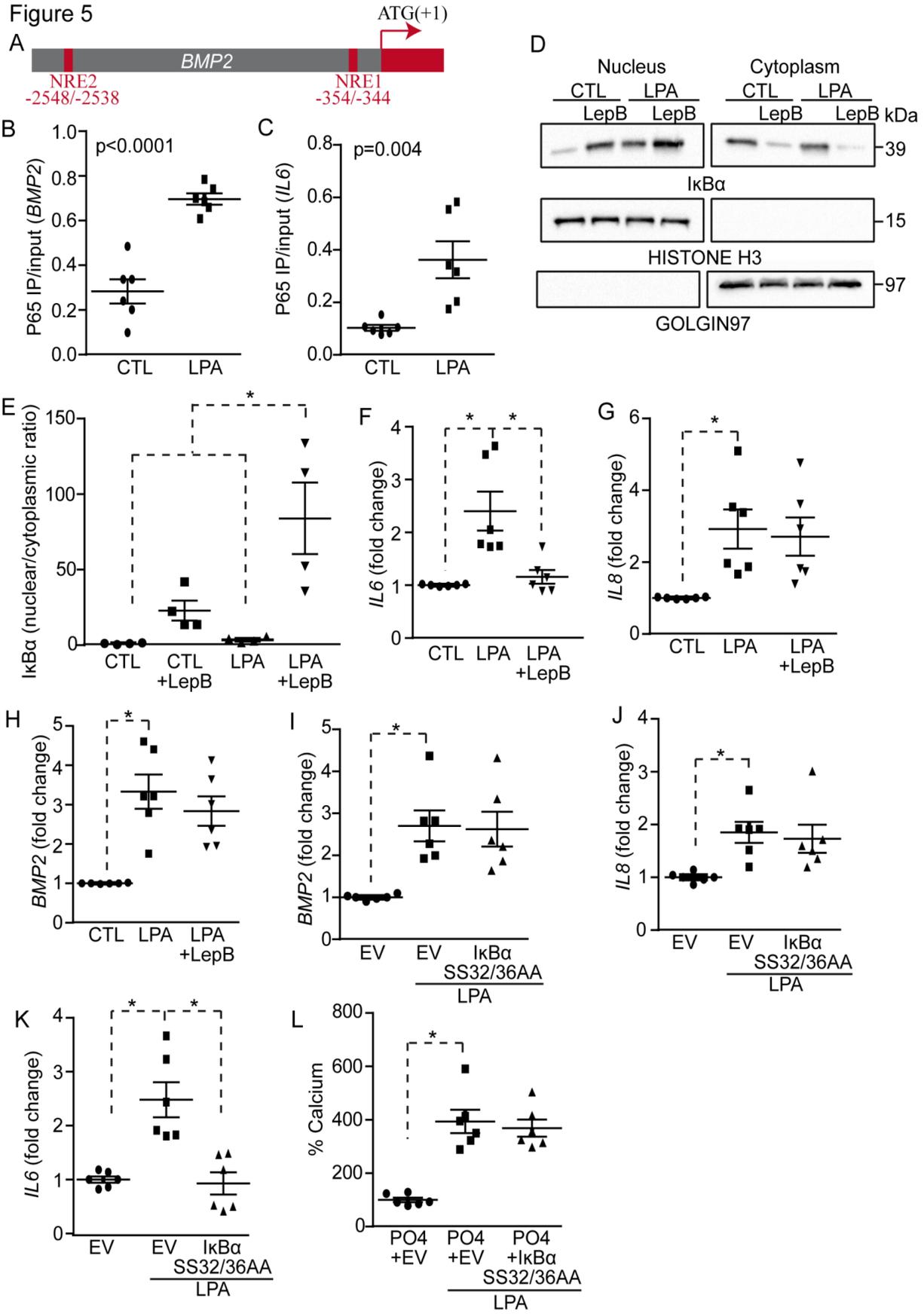


Figure 6

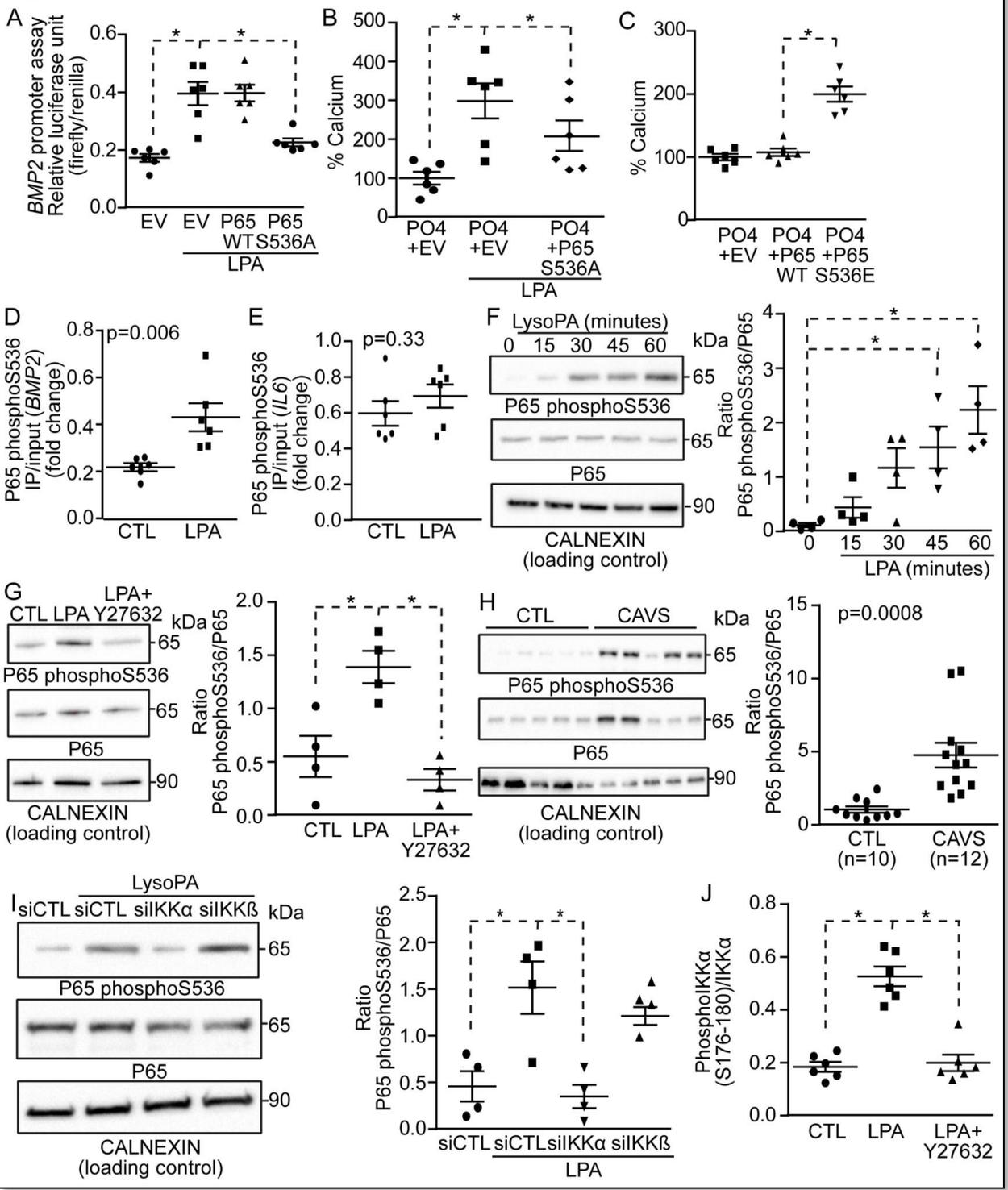
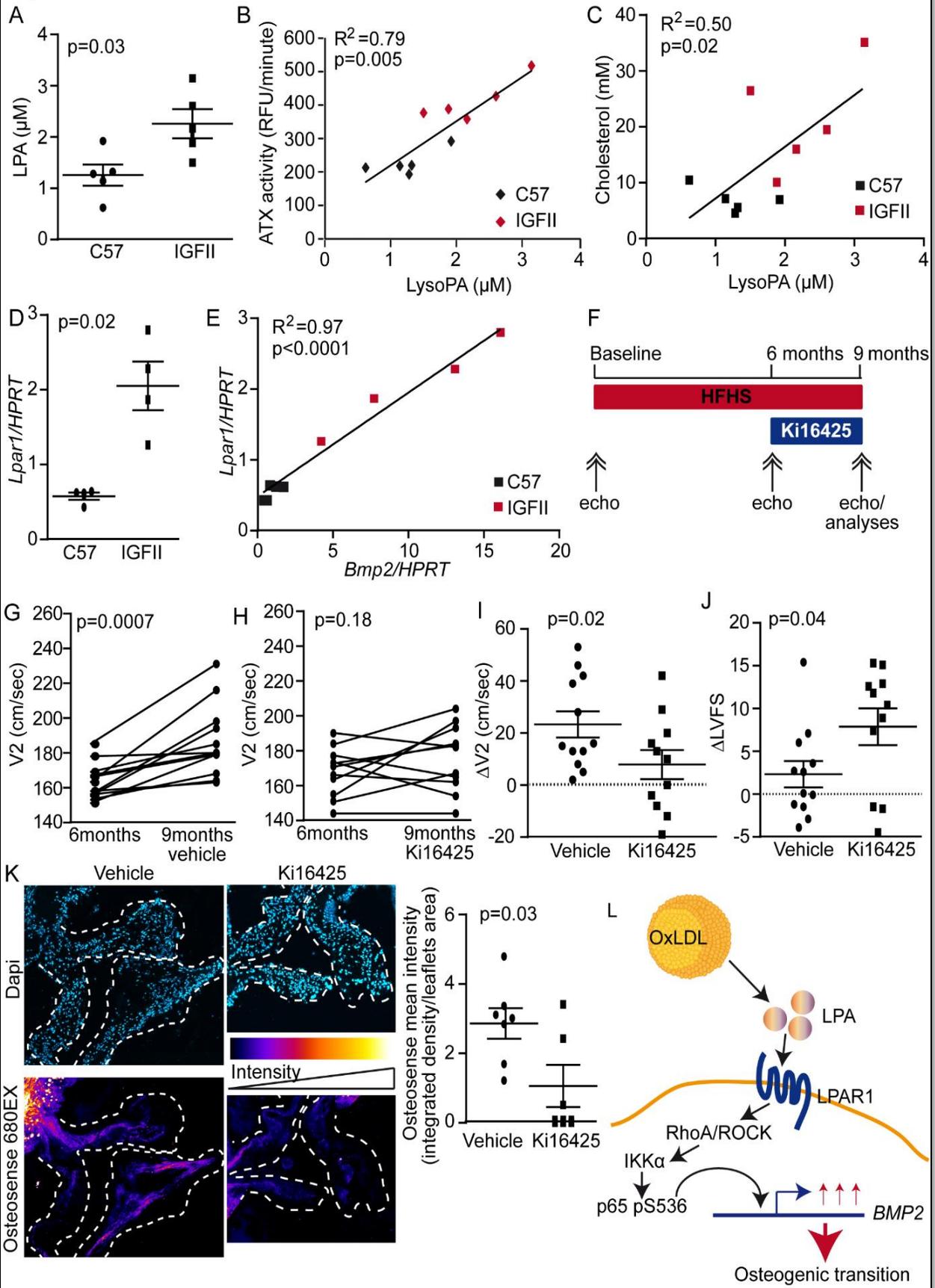
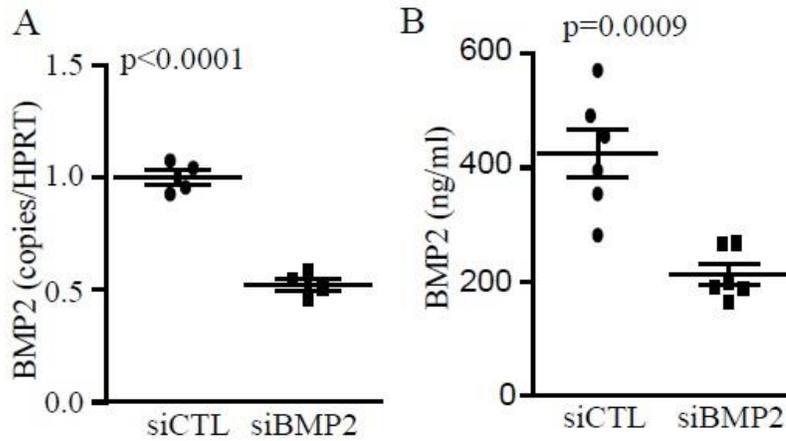


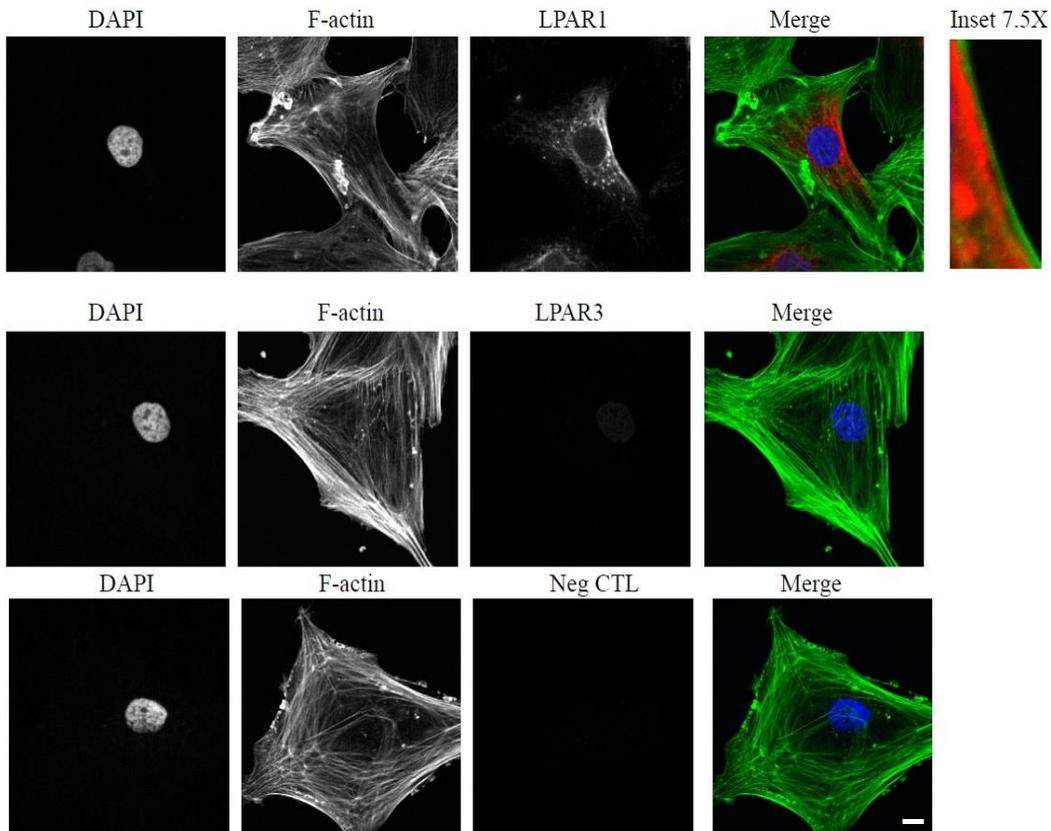
Figure 7



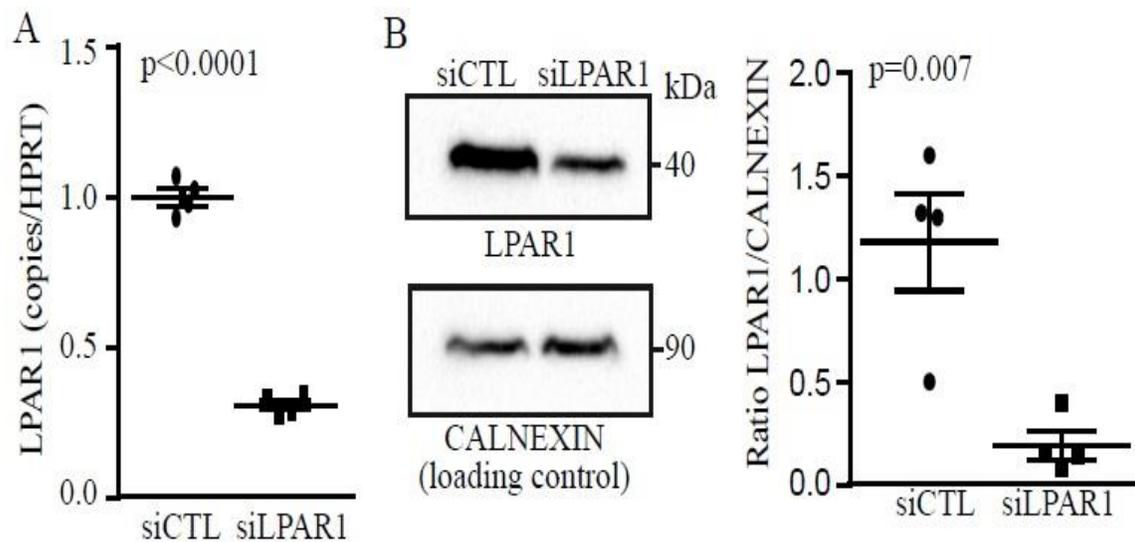
## Supplementary Figures



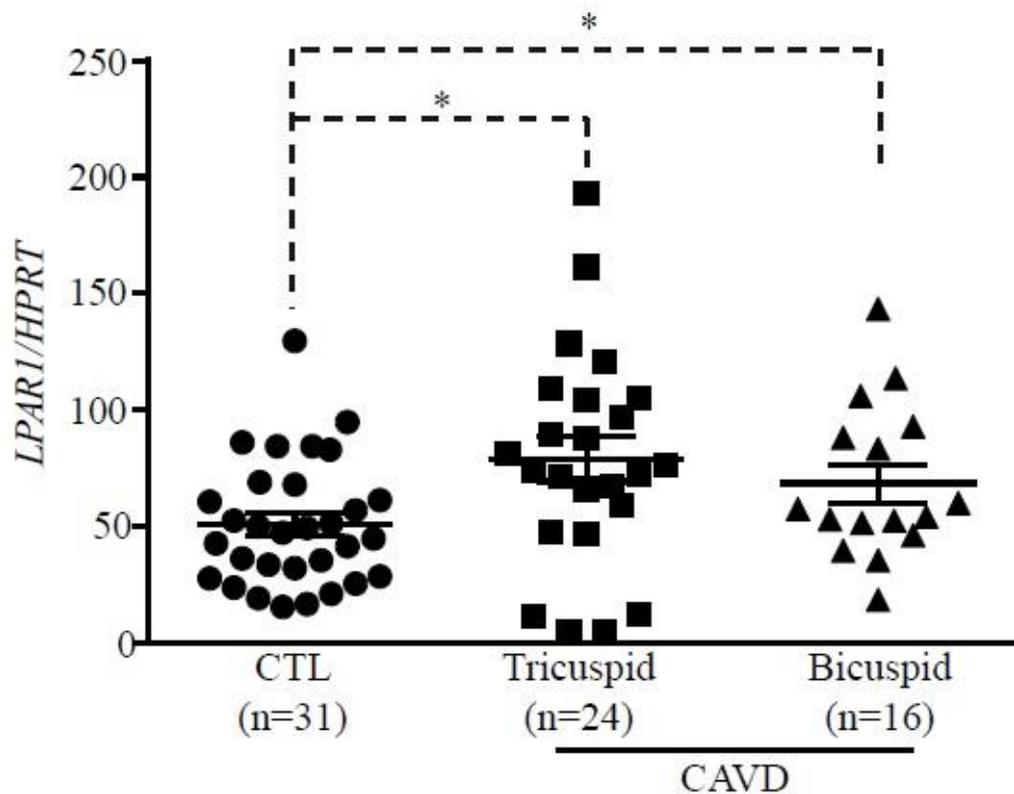
**Supplementary figure 1:** siRNA efficiency; qPCR (n=4) (A) and ELISA (n=6) (B) for siRNA against BMP2.



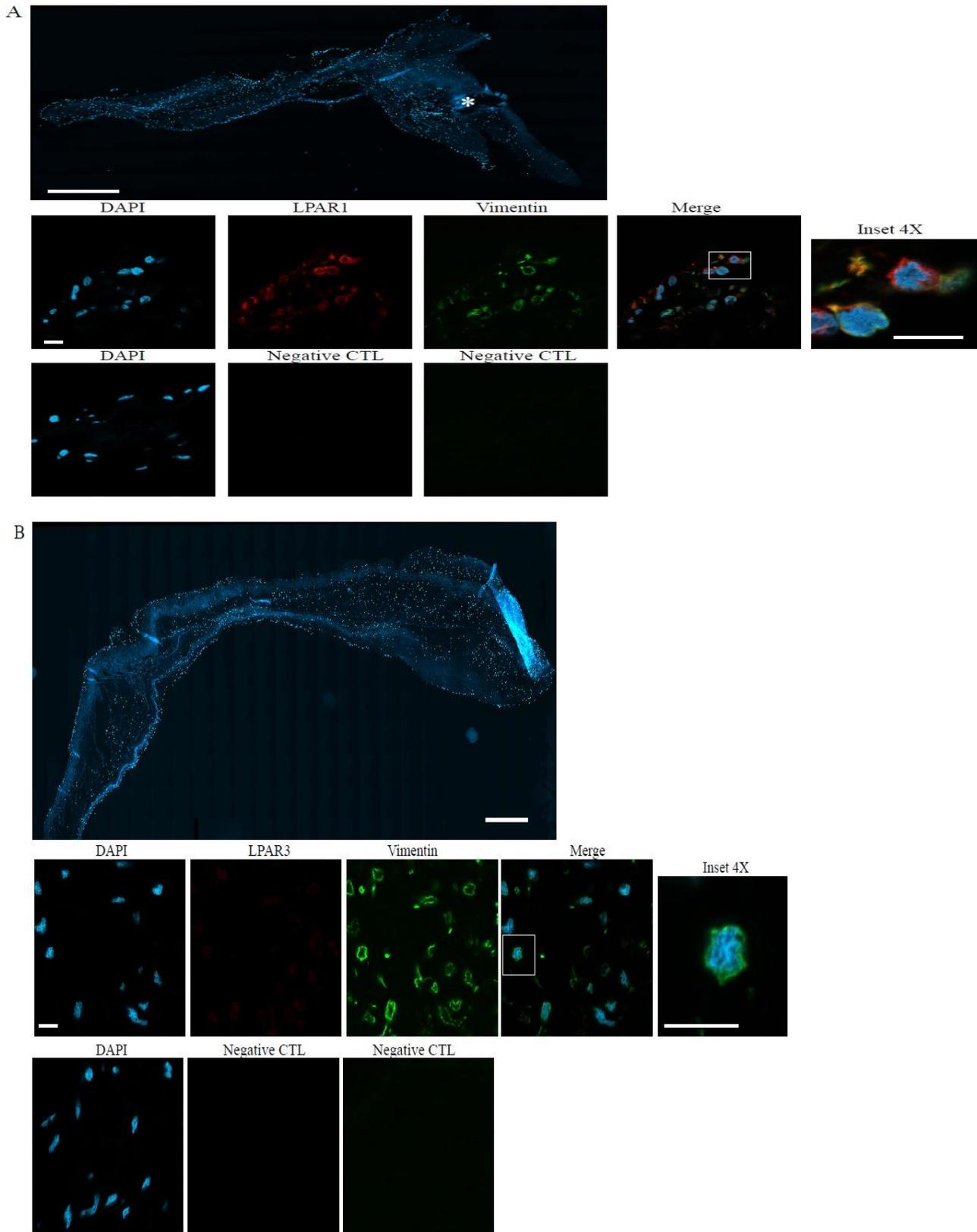
**Supplementary figure 2:** Confocal images of LPAR1 (n=5) and LPAR3 (n=2) stainings in human VICs. Scale bars 10µM.



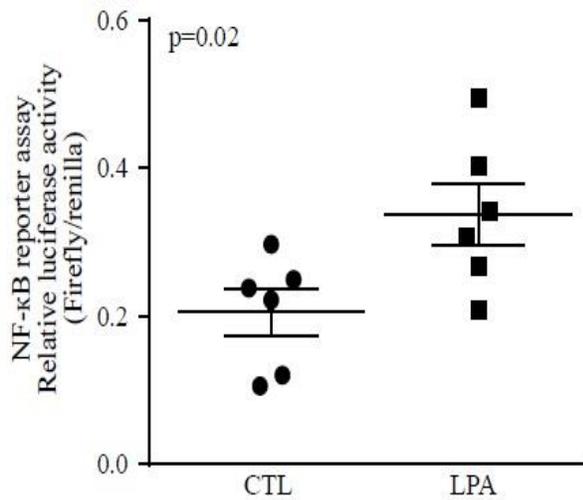
**Supplementary figure 3:** siRNA efficiency; qPCR (n=4) (A) and western blot (n=4) (B) for siRNA against LPAR1.



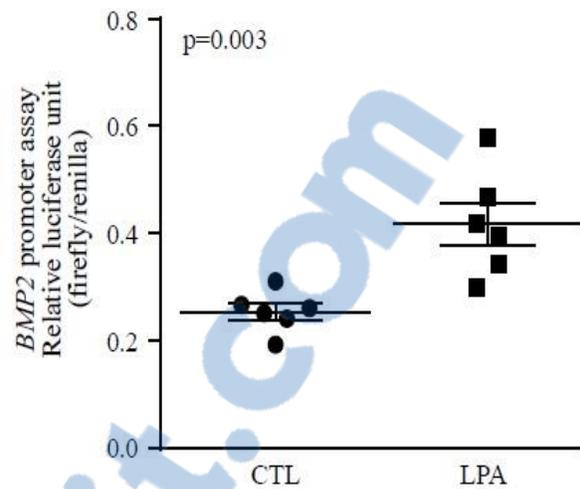
**Supplementary figure 4:** qPCR analysis showing the expression of *LPAR1* in control non calcified valves versus tricuspid and bicuspid calcified valves.



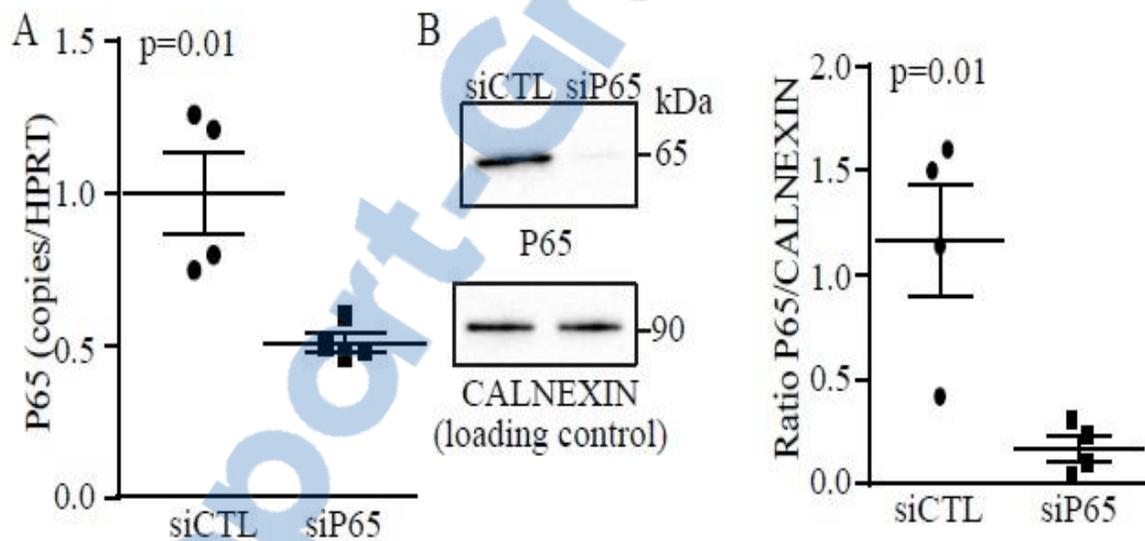
**Supplementary figure 5: A-B)** Tiling of epifluorescence images of DAPI staining showing tissue organization, scale bars 1000 $\mu$ M. Confocal images of LPAR1 (A) (n=10) and LPAR3 (B) (n=5) with vimentin, scale bars 10 $\mu$ M.



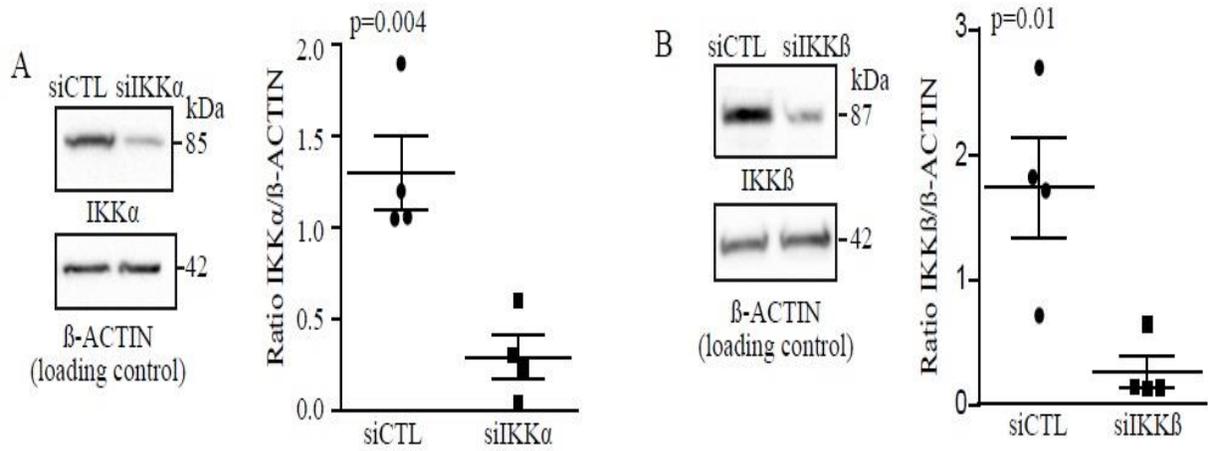
**Supplementary figure 6:** NF- $\kappa$ B reporter assay, effect of LPA (10 $\mu$ M) on NF- $\kappa$ B activity in human VICs (n=6).



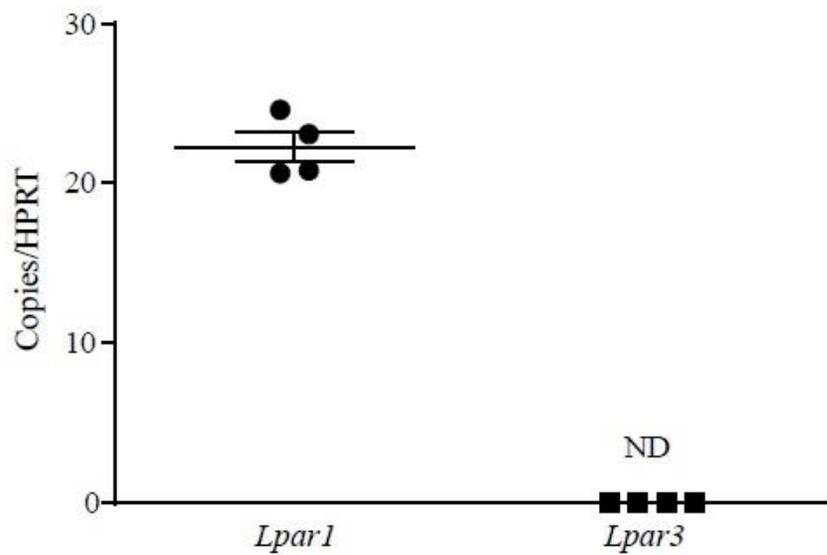
**Supplementary figure 7:** *BMP2* promoter assay, effect of LPA (10 $\mu$ M) on *BMP2* promoter activity in human VICs (n=6).



**Supplementary figure 8:** siRNA efficiency; qPCR (n=4) (A) and western blot (n=4) (B) for siRNA against P65.



**Supplementary figure 9:** siRNA efficiency; western blots for siRNA against IKK $\alpha$  (n=4) (A) and IKK $\beta$  (n=4) (B).



**Supplementary figure 10:** qPCR analysis of *Lpar1* and *Lpar3* in mouse VICS (n=4).

# Chapitre 7: Discussion, Perspectives et Conclusion

## **Résumé des articles de la thèse**

En premier lieu, notre étude cas-témoins sur 300 patients atteints de coronaropathie (Article 1- Chapitre 4) rapporte que les patients qui présentent à la fois la maladie coronarienne (MC) et le RAC ont un taux plasmatique significativement plus élevé de Lp(a), d'OxPLs ainsi qu'une forte activité d'ATX par rapport aux patients ayant une MC seulement. Nous avons également montré que la masse et l'activité d'ATX sont associées de façon indépendante avec le RAC chez les patients ayant une MC. Dans la même étude, nous avons constaté qu'une activité élevée d'ATX, combinée avec un taux élevé de Lp(a) ou de OxPLs, augmente de 3.5 à 5.5 le risque de développer le RAC. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'ATX et Lp(a)/OxPLs interagissent pour augmenter le risque de RAC. De ce fait, l'axe ATX-lipoprotéines peut jouer un rôle important dans la progression du RAC. De plus, nous avons pu identifier que les niveaux de Lp(a) et l'obésité étaient des prédicteurs puissants et indépendants de l'activité et de la masse de l'ATX. D'intérêt, le tissu adipeux semble être la source majeure qui produit et sécrète l'ATX circulante, mais non la seule. En effet, une réduction de 40% des taux de LPA circulants a été observée chez un modèle murin conditionnel spécifique au tissu adipeux (ATX<sup>F/F</sup>/aP2-Cre) [540, 525]. Ces données nous laissent donc penser que l'obésité, un facteur de risque du RAC, contribue à l'augmentation des taux circulants de l'ATX [526]. Ce dernier pourrait donc favoriser la minéralisation de la VA et exacerber la progression du RAC.

Par ailleurs, les résultats de la **deuxième étude** de mon doctorat (Article 2 Chapitre 5) apportent des arguments en faveur de l'hypothèse que l'ATX est un intermédiaire important entre Lp(a)/OxPLs, l'inflammation et la minéralisation de la VA. D'abord, nous avons démontré que l'ATX est enrichie dans la fraction isolée du Lp(a), et elle est transportée dans la VA de patients atteints du RAC. En effet, en utilisant la technique de « Proximity ligation assay », nous avons confirmé la présence d'une forte interaction entre l'ATX et Lp(a) dans les échantillons pathologiques de VA. Aussi, l'ATX est fortement exprimée par les CIVs. Ces données suggèrent que l'ATX provenant de Lp(a) et sécrétée par les CIVs pourrait contribuer à la pathobiologie du RAC.

Dans ce travail, nous avons également révélé que l'activité enzymatique de l'ATX était significativement plus élevée dans les VA minéralisées comparativement au VA saines. Ainsi, cette activité d'ATX était associée à une forte quantité de LPA dans les tissus des

VA. D'ailleurs, en utilisant la méthode de spectrométrie de masse en tandem, une étude récente a confirmé la présence des espèces de LPA dans les tissus de VA minéralisées [213]. Ces études valident nos observations précédentes. Également, nos études *in vitro* sur des CIVs isolées ont démontré que l'ATX induit l'inflammation et la transition ostéogénique en produisant une grande quantité de LPA. Ce dernier favorise, à son tour, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B/*IL-6* et l'expression des gènes ostéogéniques tels que *BMP2* et *RUNX2*. En effet, *BMP2* est un morphogène qui induit un phénotype ostéogénique des CIVs via le facteur de transcription *RUNX2* [527]. Par la suite, nous avons constaté que la minéralisation des CIVs induite par le LPC a été bloquée par le Ki16425, un inhibiteur des récepteurs LPAR1-3. En dernier lieu, nous avons testé notre hypothèse dans un modèle murin de RAC. Nos résultats *in vivo* ont démontré que le taux plasmatique et l'expression de l'ATX dans la VA étaient plus élevés chez les souris IGFII par rapport aux souris contrôles C57BL/6. L'administration exogène de LPA chez ses souris IGFII pendant 6 mois a augmenté l'expression du gène ostéogénique *Bmp2*, et a accéléré la progression du RAC. Pris ensemble, les résultats de cette étude suggèrent que l'axe ATX-LPA joue un rôle central dans la pathobiologie du RAC.

Faisant suite à l'identification de LPA comme un puissant facteur pro-inflammatoire et pro-ostéogénique impliqué dans le développement et l'évolution du RAC, j'avais comme objectif d'étudier le mécanisme moléculaire par lequel les LDL oxydées (OxLDLs) et le LPA peuvent favoriser la minéralisation de la VA (article 3 chapitre 6). Pour ce faire, nous avons d'abord évalué l'effet des OxLDLs sur la minéralisation des CIVs. Dans cette dernière étude, nous avons démontré que le traitement des CIVs avec des OxLDLs augmente les niveaux de calcification. À la lumière de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la minéralisation de la VA est due à une forte production de LPA lors de l'oxydation des LDLs. D'une part, nous avons démontré que le LPA induit un phénotype ostéogénique des CIVs. D'autre part, nous avons déterminé que la réponse ostéogénique induite par les OxLDLs ainsi que le LPA est médiée par le récepteur LPAR1. Par ailleurs, ce récepteur était hautement exprimé dans les tissus de VA sténosées comparativement au tissus contrôles.

Par la suite, nos résultats ont démontré que la minéralisation induite par LPAR1 est régulée par la voie RhoA. Cette dernière agit en amont de voie inflammatoire NF- $\kappa$ B. Ces

résultats corroborent donc les résultats que nous avons obtenus précédemment (Article2 Chapitre5) qui soulignent l'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans le processus de minéralisation des CIVs. Dans ce second projet, nous avons prouvé pour la première fois que le LPA favorise le recrutement de la sous-unité p65 phosphorylé sur Ser536 (p65-S536) au niveau de promoteur du gène *BMP2*. La phosphorylation Ser536 module, à son tour, le niveau d'expression du gène *BMP2* et favorise la réponse ostéogénique des CIVs. De même, avons constaté que p65 phospho S536 est augmenté dans les VA minéralisées comparativement aux VA normale. Étant donné que cette phosphorylation S536 n'est pas réprimée par l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ , il est possible que cette dernière puisse déclencher une inflammation ainsi qu'une minéralisation non réversible dans la VA. Par conséquent, nos résultats soutiennent l'hypothèse que le gène ostéogénique *BMP2* est sous le contrôle d'une signature p65 phospho S536 dans les CIVs.

En dernier lieu, dans un modèle murin, nous avons démontré que le taux sérique de LPA est augmenté de manière significative chez les souris IGFII, sous un régime HF-HS pendant 6 mois, par rapport aux souris témoin C57BL/6. Par ailleurs, nous avons retrouvé une forte corrélation entre le niveau de LPA et l'activité plasmatique d'ATX mesuré chez les mêmes groupes de souris. De façon similaire, nous avons révélé une forte expression de *Lpar1*. Son expression était également corrélée avec celle de *Bmp2* chez les mêmes groupes de souris. De façon intéressante, nos résultats ont montré que l'inhibition de *Lpar1* par le Ki16425 chez le même modèle animal réduit de 3 fois la progression du RAC. Ainsi, en utilisant un agent fluorescent (OsteoSense) qui détecte l'hydroxyapatite de calcium dans le feuillet de la VA, nous avons révélé que le blocage de *Lpar1* réduit le dépôt des minéraux et prévient la minéralisation de la VA. Pris ensemble, les résultats de cette étude corroborent les observations précédentes et suggèrent que l'oxydation des lipoprotéines favorise la minéralisation de la VA via la voie ATX-LPAR1-pSer536.

### **Mise en contexte et intégration des travaux**

L'ensemble des résultats obtenus dans mon doctorat apporte des éléments nouveaux dans la pathogenèse du RAC. En particulier, ils suggèrent que l'un des mécanismes prédominants dans cette pathogenèse serait lié à la lipoprotéine Lp(a)/OxPLs et à l'axe ATX-LPAR1.

Tout d'abord, nos évidences indiquent que le RAC serait initié par l'infiltration puis l'oxydation des lipides. Ces lipides oxydés seront à leur tour métabolisés par une voie enzymatique qui implique l'axe Lp(a)-ATX. Dans la VA, ce système enzymatique peut générer de nombreux dérivés lipidiques qui jouent un rôle primordial dans la transition ostéogénique des CIVs. À ce propos, plusieurs études précédentes ont démontré que les apolipoprotéines et les lipides oxydés se trouvent à proximité des nodules des VA calcifiées [83,107, 109]. Nos différentes observations supportent donc l'idée que l'oxydation des lipides dans la VA pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'initiation et/ou le développement des processus physiopathologiques associés au RAC.

Par ailleurs, il a été démontré que les LDLs, petites et denses, sont augmentées chez les patients atteints du syndrome métabolique, un facteur de risque pour le développement du RAC [89, 109]. Récemment, Lehti et al. ont montré que les lipoprotéines modifiées s'accumulent dans les VA minéralisées. Ainsi, plusieurs espèces lipidiques provenant de LPC, un métabolite actif qui est produit au cours de l'oxydation des LDLs, étaient présentes dans les tissus valvulaires [528]. Ces études soutiennent notre hypothèse que les dérivés lipidiques, produits par voie enzymatique dans la VA, peuvent jouer un rôle primordial dans le développement du RAC.

Dans l'étude clinique (Article 1 Chapitre 4), nous avons pu montrer que l'ATX, la Lp(a) et les OxPLs interagissent ensemble pour augmenter le risque du RAC. Nos résultats sont cohérents avec d'autres études qui démontrent que la Lp(a) est associée avec le développement du RAC [109]. En effet, dans une première étude effectuée en 1997, Stewart et ses collègues ont démontré que la Lp(a) et les LDLs étaient associées avec le RAC [34]. Récemment, Thanassoulis et collègues ont identifié un SNP dans le locus du gène *LPA* (rs10455872) associé à la calcification de la VA [35]. Ainsi, par une approche de randomisation Mendélienne, le même groupe de recherche a démontré un lien causal entre les taux de Lp(a) et le risque de développement du RAC. Ces constatations ont été confirmées par deux études indépendantes, qui ont mis en évidence un lien causal entre les niveaux du biomarqueur Lp(a) et le risque de développer un RAC [36-38]. Capoulade et ses collègues ont démontré que les niveaux circulants de Lp(a) et les phospholipides oxydés (OxPL-apoB) sont associés de façon indépendante à la progression du RAC [38]. Pris ensemble, les résultats de ces études ci-dessus vont dans le même sens que nos résultats et

suggèrent que la Lp(a) et son contenu en OxPLs pourraient avoir un impact important sur le développement du RAC. Nos résultats viennent également renforcer l'étude de Kamstrup et al. qui démontre que les niveaux élevés d'OxPL-apoB et OxPL-apo(a) sont des facteurs de risque associés avec la pathogenèse du RAC [336].

De plus, certaines études appuient le rôle du Lp(a) comme un transporteur majeur d'OxPLs dans le plasma et dans la VA [109]. Ces OxPLs peuvent agir comme des puissants lipides bioactifs qui favorisent l'inflammation. Nos données peuvent donc expliquer en partie l'association du Lp(a) avec le développement du RAC.

Par ailleurs, il a été démontré que les OxPLs sont associés préférentiellement à la Lp(a) [307]. De façon intéressante, les enzymes associés à la Lp(a) et aux particules LDLs peuvent métaboliser les OxPLs qui sont accumulés au niveau valvulaire [109]. En effet, la Lp-PLA2, utilise comme substrat les OxPLs pour produire des AGs et la LPC. Cette dernière, qui est le produit final de la Lp-PLA2, déclenche à son tour l'inflammation et la minéralisation de la VA [109, 347]. D'intérêt, la Lp-PLA2, transportée par les LDLs, est surexprimée lors du RAC et est également enrichie dans la fraction Lp(a) [101]. Ces travaux ci-dessus supportent les résultats de notre seconde étude (Article 2 Chapitre 5) dans laquelle on démontre que l'ATX est transportée par des lipides, et il est fortement secrétée par les cellules valvulaires. Cette enzyme hydrolyse son substrat, le LPC pour produire une grande quantité du LPA dans la VA. Le LPA agit à son tour comme un facteur pro-inflammatoire ayant des propriétés ostéogéniques. En effet, nous avons pu démontrer que l'ATX, enrichie dans la fraction Lp(a), agit comme une étape limitante dans la l'activation de l'inflammation et la minéralisation de la VA. Ces résultats concordent bien avec les données d'une étude récente effectuée par l'équipe de Tsimikas et al. qui ont confirmé une association entre l'ATX et les particules de Lp(a) à la fois dans le plasma et dans les VA des patients atteints du RAC [213]. En effet, ils ont remarqué que l'ATX pourrait être détectée sur l'apo(a) ainsi que l'apoB. D'ailleurs, l'apo(a) était également présente dans les VA de sujets atteints de RAC. En particulier, ils ont détecté l'apo(a), les OxPLs et l'ATX dans le grade le plus avancé du RAC [213]. Ces découvertes appuient encore nos constatations qui démontrent que l'ATX interagit avec les particules de Lp(a) pour être transportée dans la VA.

Dans notre seconde étude (Article 2 Chapitre 5), nous avons remarqué que le LPA, le produit final de l'ATX, est augmenté dans la VA calcifiées. En effet, au niveau valvulaire, on a observé un taux élevé de LPA par rapport au LPC. Ces données concordent avec celles de Torzewski et al. qui ont confirmé la présence des différentes espèces de LPA ainsi qu'une variété d'OxPLs dans les VA calcifiées [213]. Ces résultats viennent donc renforcer l'hypothèse que l'ATX, qui est transportée par les lipides et secrétée par les CIVs, catalyse la conversion de LPC en LPA. À ce propos, puisque les OxPLs et les OxLDLs sont retrouvés en quantité considérable dans la VA [213], il est probable qu'une grande partie du LPC provienne de l'hydrolyse des acides gras oxydés (en position sn2) qui sont situés sur les OxPLs. Très récemment, une étude faite chez les CIVs a démontré que la Lp(a) augmente de façon significative l'activité de la phosphatase alcaline, le niveau d'hydroxyapatite, et la formation des vésicules cellulaires contenant du calcium [530]. Cette étude confirme l'association entre la Lp(a) et la calcification valvulaire aortique. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires afin de déterminer le processus moléculaire par lequel Lp(a)-ATX et OxPLs favorisent la minéralisation de la VA. Les résultats de notre seconde étude révèlent que les niveaux élevés de LPA, générés dans la VA, favorisent l'inflammation et la minéralisation des CIVs par la voie NF-kB/IL-6/BMP. Sur ce point, une étude de notre groupe a précédemment rapporté que l'IL-6, une cible importante de la voie NF-kB, est fortement exprimée dans les VA calcifiées [125]. La voie NF-kB est aussi activée dans les VA humaines et induit la production d'une grande quantité d'IL-6. Il a été constaté que l'IL-6 stimule l'expression du gène ostéogénique *BMP2* par effet paracrine [125]. Ces résultats sont cohérents avec une étude récente effectuée *in vitro* avec des CIVs qui démontre que l'expression de *BMP2* a été fortement induite par la Lp(a)[530]. En dernier lieu, nous avons montré que l'administration de LPA dans un modèle murin de RAC accélère la progression du RAC. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Zhou et al. qui démontre que l'administration de LPA chez les souris apoE<sup>-/-</sup> (à la même dose utilisée dans cette étude) pendant 4 semaines accélère l'inflammation et le développement de l'athérosclérose [475].

Finalement, les résultats de notre troisième étude (Article 3 Chapitre 6) démontrent que le LPA, généré lors de l'oxydation des LDLs, active son récepteur LPAR1 et déclenche une réaction inflammatoire NF-kB/p65 phospho ser536. Cette signature ostéogénique

aboutira à la minéralisation des CIVs. D'abord, des études antérieures avaient mis en évidence que, lors du processus d'oxydation des LDLs, les OxPLs sont transformés en LPC grâce à l'enzyme Lp-PLA2 [346]. Nos observations sont cohérentes avec les résultats d'études précédentes qui ont montré que le LPA est synthétisé au cours de l'oxydation des LDLs [531] et lors de l'activation des plaquettes [440]. En plus des études antérieures, nos données (Articles 1 et 2 -Chapitres 4 et 5) nous laissent donc penser que l'oxydation des LDLs peut générer une quantité élevée de LPA d'une manière dépendante de l'ATX.

De surcroît, nos résultats sont corroborés par ceux de Zhou et al. [475] qui soulignent le rôle de LPA dans le processus atherosclérotique. En effet, le LPA, généré lors de l'oxydation des LDLs, agit par les récepteurs LPAR1-3 et favorise l'adhésion monocytaire à la paroi artérielle via CXCL1[475]. Par conséquent, nos données sont compatibles avec le concept selon lequel l'oxydation des LDLs donne lieu à la formation du LPC. Celui-ci est le substrat majeur à partir de quel l'ATX produit du LPA. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de déterminer si le LPA provenant des OxLDLs est produit par un processus enzymatique qui dépend de l'ATX. Dans un deuxième temps, notre dernier article a permis d'éclairer le mécanisme d'action par lequel les OxLDLs et LPA favorisent la minéralisation de la VA. En effet, nous avons observé que les OxLDLs et le LPA induisent l'expression du gène *BMP2* via l'activation du récepteur LPAR-1 et la voie NF- $\kappa$ B/p65 phospho Ser536. Ces résultats concordent avec de nombreuses études précédentes qui ont souligné que les OxPLs, transportés par la Lp(a) dans la VA, contribuent à l'augmentation des ROS, qui, à leur tour, favorisent l'activation de NF- $\kappa$ B et l'expression des gènes inflammatoires [81,93]. Par ailleurs, une étude effectuée sur des CEa a également démontré que les OxLDLs induisent l'expression de *BMP2* via les récepteurs TLR-2 et TLR-4 [337]. D'ailleurs, ces deux récepteurs sont impliqués dans la transition ostéogénique des CIVs [95, 343]. Ces différentes données viennent supporter nos résultats qui suggèrent que les OxLDLs et le LPA favorisent la réponse inflammatoire et le remodelage de la VA. Enfin, dans notre modèle de souris IGFII, nous avons pu démontrer que le blocage de Lpar1 par le Ki16425 réduit la progression du RAC chez ces souris. Ces résultats sont cohérents avec les résultats d'une étude récente effectuée dans un modèle de souris athérosclérotique qui démontre que l'inhibition de Lpar1-3 réduit le développement de l'athérosclérose chez des souris déficientes en récepteurs *Ldlr* (*Ldlr*<sup>-/-</sup>) [465]. D'autres études ont révélé une

forte expression de LPAR-1 et 3 dans la plaque atherosclérotique [475]. En effet, le traitement par le Ki16425 a réduit la progression des lésions atherosclérotiques chez les souris hyperlipidémiques *ApoE*<sup>-/-</sup> [475]. Étant donné que la maladie du RAC partage certaines similitudes avec l'athérosclérose en termes de facteurs de risque associé, ces données viennent renforcer l'hypothèse que l'inhibition pharmacologique de récepteur LPAR1 peut s'avérer une approche prometteuse pour diminuer la progression du RAC. Néanmoins, certaines études suggèrent que les souris *Lpar1*<sup>-/-</sup> présentent une réduction globale de l'ostéogenèse et de la masse osseuse [532]. Une étude publiée récemment a démontré que le dérivé de la tétrahydrocarboline ONO-8430506, un puissant inhibiteur de l'ATX, réduit complètement la formation de LPA dans le plasma *in vivo*. De façon intéressante, l'inhibition prolongée et continue d'ATX n'a pas d'impact sur le phénotype chez le rat [405].

Enfin, nous avons rapporté que le récepteur LPAR1 induit une signature p65 phospho S536. Cette dernière module l'expression du gène *BMP2* et provoque ainsi une réponse inflammatoire et ostéogénique prolongée. Par conséquent, choisir p65-ser536 comme une cible thérapeutique située plus bas dans la voie LPAR1-NF- $\kappa$ B pourrait être une voie à explorer. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'axe Lp(a)-ATX-LPAR1 et la signature p65 phospho S536 pourraient s'avérer des cibles intéressantes pour le traitement du RAC.

### **Implications cliniques et perspectives**

Le RAC est la forme la plus fréquente des maladies valvulaires dans le monde occidental. Malgré le gros fardeau de cette maladie, à ce jour, il n'existe aucun traitement médical capable de ralentir ou stopper son développement. Ceci est dû en partie au manque de connaissances sur les causes de cette maladie. À l'heure actuelle, le RVA est le seul traitement disponible du RAC. Il peut être effectué par un traitement chirurgical ou par voie percutanée chez les patients symptomatiques présentant une sténose aortique sévère. Toutefois, ces interventions chirurgicales sont effectuées souvent chez les patients âgés qui présentent plusieurs facteurs de risque. Ces facteurs de risque (e.g. âge, diabète, insuffisance cardiaque) sont associés à une mortalité opératoire accrue [533]. Par conséquent, l'identification des principaux facteurs de risque ainsi que les processus

moléculaires impliqués dans la progression du RAC représentent une nécessité primordiale pour développer des thérapies médicales. Ainsi, avoir un traitement médical pour le RAC pourrait améliorer considérablement la qualité de vie des patients les plus âgés et limiter le nombre de RVA avec des économies importantes pour notre système de soins de santé. D'un point de vue clinique, une pharmacothérapie pourrait être débutée chez des patients présentant une sténose aortique légère et/ou modérée [534]. Cependant, jusqu'à ce jour, les tentatives visant à réduire la progression du RAC ont subi un échec.

À ce jour, trois essais cliniques randomisés ont démontré que l'administration des statines, qui réduit efficacement le LDL cholestérol, n'avaient aucune efficacité sur la réduction de la progression du RAC [40-42]. Ces résultats ont été supportés par une méta-analyse récente qui démontre que, malgré une baisse marquée des LDLs (35-55%) pendant plus de 2 ans, il n'y a aucune réduction dans la progression du RAC [535]. Malgré le fait que l'impact des lipoprotéines n'était pas bien connu au moment de ces essais cliniques, les statines n'ont pas réduit les niveaux de Lp(a) [536].

D'une part, des études ont démontré que les statines peuvent augmenter les niveaux de Lp(a) et OxPL-ApoB [355]. Par exemple, dans l'essai clinique ASTRONOMER, la rosuvastatine a augmenté des niveaux de Lp(a) de 20% [38]. Bien que l'insuccès des statines dans cette maladie soit probablement multifactoriel, ces données peuvent expliquer, au moins en partie, leur inaptitude à prévenir la progression du RAC. D'une autre part, l'échec des statines peut être lié également à l'effet pro-ostéogénique de cette classe de médicaments [537, 538]. Ces données, suggéraient que l'effet des statines pourrait être lié aux effets pléiotropiques plutôt qu'à l'effet hypolipémiant de la médication [83-84, 95].

Les résultats obtenus dans le premier article de cette thèse (chapitre 4) démontrent que le niveau élevé de Lp(a) ou OxPLs combiné avec une haute activité d'ATX augmentent le risque du RAC. Ces résultats, y compris les études récentes, soutiennent l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'activité d'ATX peut réduire la minéralisation de la VA induite par les lipides. Par conséquent, un traitement anti-ATX avec des agents pharmacologiques tels que les inhibiteurs de l'ATX ou les oligonucléotides antisens visant à réduire les taux circulants de Lp(a) pourraient ralentir la progression du RAC. Des études prospectives randomisées sont nécessaires pour tester ces nouvelles avenues. En particulier, des études

randomisées utilisant les agents thérapeutiques en phase d'évaluation clinique (GLPG1690 en phase II chez les patients IPF) [415,416] pourraient être envisagées afin de tester leur efficacité sur le ralentissement du RAC. Par ailleurs, le développement d'un modèle murin conditionnel permettant d'éliminer spécifiquement Enpp2 dans les tissus valvulaires serait idéal pour étudier les fonctions de cette enzyme dans le contexte du RAC. Ainsi, ce modèle murin pourrait révéler le rôle exact de la voie Lp(a)-ATX-LPA dans le processus de minéralisation. Récemment, un nouvel essai immuno-enzymatique capable de détecter l'interaction ATX-Lp(a) et ATX-apo(a) ou ATX-apoB dans le plasma des patients avec RAC a été développé par l'équipe de Tsimikas et ses collaborateurs [213]. Cette découverte pourrait offrir un biomarqueur pour identifier les sujets ayant le plus grand potentiel pour bénéficier des thérapies qui visent à inhiber l'ATX en utilisant un composé pharmacologique [416].

En second lieu, compte tenu de nos résultats ainsi que les travaux récents qui suggèrent que la Lp(a) est un facteur de risque causal du RAC [538], de nouvelles stratégies destinées à diminuer le taux de Lp(a) méritent d'être étudiées à l'avenir. Ces perspectives seront nécessaires afin de tester l'hypothèse selon laquelle la diminution de Lp(a) pourrait ralentir la progression du RAC [213]. À cet égard, des études récentes indiquent que l'internalisation du Lp(a) est régulée par la protéine PCSK9 [300]. En effet, le développement d'inhibiteurs de PCSK9 est une option thérapeutique qui pourrait éventuellement abaisser le taux de Lp(a) et donc retarder le développement du RAC. Sur ce point, il a récemment été démontré que l'inhibition de PCSK9 réduit le taux circulant de Lp(a) de 25% [539]. Le développement d'autres agents plus puissants tels que les oligonucléotides antisens (ASO) ciblant l'apo (a) peut fournir une meilleure solution pour évaluer le rôle du Lp(a) dans le RAC. En effet, une compagnie pharmaceutique, IONIS, a récemment développé des ASO anti-apo(a) (dirigés contre le gène *LPA* qui code pour l'apo(a)) [321]. Ces ASO anti-apo(a) ont réduit le taux de Lp(a) d'environ 85% sans affecter le niveau d'autres marqueurs lipidiques [321]. Des essais cliniques randomisés sont donc très attendus et devraient être effectués chez les patients avec sténose aortique légère à modérée et ayant un taux élevé de Lp(a) (> 50 mg/dL).

Notre seconde étude présente aussi un impact translationnel important. En effet, nous avons démontré que l'ATX, transportée par la Lp(a) et aussi sécrétée par CIVs, est un promoteur

important de la minéralisation de la VA. Dans un modèle murin, le LPA augmente les dépôts de calcium dans les feuillets de la VA et accélère la progression du RAC. À cet égard, et compte tenu du rôle d'ATX dans la minéralisation, le ciblage d'ATX ou l'un des LPARs pourrait également fournir des pistes thérapeutiques. Bien qu'il n'existe aucun inhibiteur de l'axe ATX-LPAR approuvé sur le marché, il existe plusieurs inhibiteurs en développement et certains sont en cours d'évaluation dans des études cliniques en phase II [416]. Par conséquent, des interventions pharmacologiques ciblant la voie ATX-LPA pourraient représenter une nouvelle cible thérapeutique pour le RAC [405].

Selon les données précédentes, ces essais futurs devraient plutôt cibler une population de patients ayant un RAC léger (stade précoce de la maladie) pour ralentir la progression de la maladie et retarder la survenue du remplacement valvulaire. Ainsi, d'autres études mécanistiques et expérimentales devraient être envisagées dans les prochaines années afin de mieux comprendre le rôle de l'axe ATX-LPA dans le développement et la progression du RAC.

Pour finir, les conclusions majeures qu'on peut tirer de l'article 3 (chapitre 6) sont : le récepteur LPAR-1 est augmenté dans les valves humaines calcifiées ainsi que chez les souris IGFII sous diète HF-HS. L'étude chez la souris a été réalisée pour imiter le contexte clinique. En effet, l'administration de Ki16425, un bloqueur de Lpar1-3, a été démarrée 6 mois après le régime HF-HS lorsque les vitesses transvalvulaires étaient significativement élevées. Nous avons remarqué que l'inhibition de *Lpar1* chez les souris IGFII réduit la progression de RAC par 3 fois. Nous avons également noté que les souris recevant le Ki16425 affichaient une diminution de dépôts de minéraux dans leurs VA. Considérant l'effet bénéfique de l'inhibition pharmacologique du LPAR1 sur la progression du RAC, la présente étude peut avoir des implications cliniques importantes. En effet, compte tenu de nos résultats actuels démontrant que LPAR1 est impliquée dans la réponse ostéogénique des CIVs, il est possible que le ciblage de ce récepteur puisse aider à prévenir ou à retarder le développement de cette maladie. Sachant que de nouveaux composés pharmacologiques sont en cours de développement pour inhiber certains récepteurs de LPA, nos résultats peuvent avoir un impact translationnel. L'utilisation de modèles murins serait par contre un bon outil pour explorer l'impact de *Lpar1* sur la minéralisation de la VA. Ainsi, le

modèle murin KO conditionnel et inductible (*Lpar1<sup>-/-</sup>*) pourrait nous permettre de suivre les conséquences physiologiques de la perte de ce récepteur sur le développement du RAC. Finalement, étant donné que la phosphorylation p65 phospho S536 joue un rôle crucial dans la réponse ostéogénique des CIVs, il est possible que le ciblage de cette signature ostéogénique Ser536 puisse représenter une nouvelle cible afin de ralentir la progression du RAC. Sur ce point, il est intéressant de souligner les résultats d'une étude effectuée chez les souris qui démontre que l'injection d'un peptide compétitif dirigé contre la phosphorylation p65-Ser536 réduit la fibrose hépatique sans affecter la réponse immunitaire innée [505]. Par conséquent, une perspective intéressante serait l'utilisation des peptides thérapeutiques qui agissent de façon spécifique contre la phosphorylation de la Ser536 de p65. Cela pourrait prévenir l'expression du gène *BMP2*, et donc réduire la minéralisation de la VA.

### **Limitations**

Tout d'abord, le premier travail (chapitre 4) a été effectué chez des patients ayant une MC et atteints du RAC à un stade pathologique avancé. De ce fait, nos conclusions actuelles ne peuvent pas nécessairement être transposées à la phase initiale du processus de la maladie. D'autre part, nos observations montrent seulement une association entre l'ATX et le RAC.

À cet égard, d'autres études randomisées (RM) sont nécessaires pour évaluer la causalité entre ce biomarqueur et la maladie. En dépit des résultats encourageants de cette étude rétrospective, certaines limitations doivent être soulevées. D'abord, il serait intéressant d'évaluer si la masse et l'activité d'ATX sont également associées avec la progression du RAC dans les stades légers à modérés. Ensuite, il reste à déterminer si chez des patients avec RAC mais sans CAD, l'ATX pourrait être associée au risque de RAC via l'interaction avec Lp(a) et OxPL-ApoB. Étant donné que la bicuspidie est un facteur de risque pour le RAC, il serait important de confirmer nos résultats chez une large cohorte de patients incluant ceux avec des VA bicuspidies. Plusieurs études ont démontré une relation de causalité entre la Lp(a) et le RAC [35-38]. Dans le même ordre d'idée et bien qu'il n'y a pas de lien de causalité établi entre ATX et RAC; les travaux de cette thèse suggèrent un lien potentiel puisqu'ATX se retrouve dans une voie impliquant Lp(a).

Dans la deuxième étude (chapitre 5), une des limitations est que l'expression et l'activité d'ATX ont été documentées dans les tissus des patients atteints du RAC à un stade avancé. Donc, la corrélation entre ATX et le score de remodelage était limitée aux tissus à un stade avancé de la maladie.

Finalement, dans la dernière étude (chapitre 6), nous avons souligné que l'inhibition de Lpar1 par le Ki16425 ralentit la progression du RAC. Cependant, nous ne pouvons conclure avec certitude que des effets secondaires du Ki16425 (*off-target effects*) n'ont pas participé à l'effet observé sur la minéralisation de la VA. Néanmoins, ce travail a souligné que cet inhibiteur peut représenter une nouvelle classe de médicaments afin de traiter le RAC. Bien que le profil d'expression de LPAR1-3 soit maintenant bien connu dans le RAC, des questions demeurent quant à l'expression d'autres récepteurs Lpar 4-6 dans ce modèle. Étant donné que la souris *Lpar1*<sup>-/-</sup> possède un taux de mortalité périnatale élevé avec une dysmorphie crânienne, le rôle de ce récepteur dans le RAC pourrait être étudié en utilisant un modèle de souris avec une déficience conditionnelle en *Lpar1*. Toutefois, d'autres études expérimentales et cliniques sont nécessaires pour évaluer le potentiel thérapeutique de l'inhibition de ce récepteur dans le développement du RAC.

# Conclusion générale

Le RAC est une pathologie très complexe. C'est une maladie caractérisée par une minéralisation progressive faisant intervenir plusieurs processus, notamment la rétention des lipides, l'inflammation, le remodelage fibrotique et la calcification ectopique de la VA. À ce jour, il n'existe aucun traitement médical pouvant arrêter ou même ralentir sa progression. L'infiltration des lipides et leur oxydation sont des processus clés dans le développement du RAC. Les travaux de recherche effectués lors de mon doctorat ont permis de mettre en évidence l'implication des facteurs liés à la signalisation des lipides dans la pathobiologie de RAC. En effet, durant mes études de doctorat j'ai pu démontrer le rôle de l'axe des lipides Lp(a)-ATX-LPAR1 dans la minéralisation de la VA.

Ce doctorat a permis dans un premier temps de mettre en évidence une interaction entre l'enzyme ATX et la lipoprotéine Lp(a). Cette interaction était associée avec un risque plus élevé de RAC. En second lieu, j'ai pu montrer que l'ATX est enrichie dans la fraction du Lp(a) et favorise l'inflammation et la transition ostéogénique des CIVs via l'activation du récepteur LPAR-1 et de la voie NF-KB-p65-Ser536/BMP2. De plus, dans un modèle animal du RAC, j'ai pu démontrer que le Ki16425 possède une action bénéfique sur la progression de la maladie. Ces résultats supportent le concept que l'inhibition des LPARs dans la pathologie du RAC serait une avenue thérapeutique prometteuse. Toutefois, d'autres études moléculaires qui auront comme objectif de mieux définir le rôle de l'ATX-LPAR-1 dans la pathobiologie du RAC seront éventuellement nécessaires. Ainsi, d'autres travaux mécanistiques méritent d'être effectués dans les prochaines années afin de mieux comprendre le processus par lequel Lp(a)/OxPL-LPA provoquent la transdifférenciation ostéogénique chez les CIVs.

Pour terminer, les découvertes présentées dans cette thèse ouvrent de nouvelles perspectives de recherche afin de développer de nouvelles thérapies visant à améliorer la santé des patients souffrant du RAC. Finalement, ce doctorat a permis de mettre en lumière certains facteurs contribuant à l'initiation et le développement du RAC et d'ouvrir la voie à des investigations futures.

# Bibliographie

1. Eweborn GW, Schirmer H, Heggelund G, Lunde P, Rasmussen K. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. *Heart* 2013;99(6):396-400.
2. Otto CM. Calcific Aortic Stenosis: Time to look more closely at the valve. *N Engl J Med* 2008; 359:13:1395-1398.
3. Freeman RV and Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 2005; 111:3316–3326.
4. Otto CM. Timing of aortic valve surgery. *Heart* 2000;84(2):211-8.
5. Park SJ, Enriquez-Sarano M, Chang SA et al. Hemodynamic patterns for symptomatic presentations of severe aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol Img* 2013;6(2):137-46.
6. Otto CM. Calcific aortic valve disease: new concepts. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2010;22(4):276-84.
7. Pellikka PA, Nishimura RA, Bailey KR, Tajik AJ. The natural history of adults with asymptomatic, hemodynamically significant aortic stenosis. *J.Am.Coll.Cardiol* 1990;15(5):1012-7.
8. Goldberg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V. Insights into degenerative aortic valve disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 50 (13): 1205-1213.
9. Manji RA, Mens AH, Ekser B, Cooper DK. Porcine bioprosthetic heart valves: The next generation. *Am Heart J* 2012; 164:177-85.
10. Roberts WC, Ko JM. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation* 2005 22;111(7):920-5.
11. Otto CM, and Bonow RO. Valvular Heart Disease: A Companion to Braunwald's Heart Disease, 3<sup>rd</sup> edition 2010. Elseviers Saunders.
12. Siu SC, and Silversides CK. Bicuspid aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol* 2010 Jun 22;55(25):2789-800.
13. Nuran Yener G, Levent Oktar, Dilek Erer et al. Bicuspid aortic valve. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2002. 8(5): p. 264-7.
14. Garg V, Muth AN, Ransom JF et al. Mutations in NOTCH 1 cause aortic valve disease. *Nature* 2005 September 8;437(7056):270-4.
15. Iung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol* 2011 March;8(3):162-72.

16. Sawaya F, Liff D, Stewart J, Lerakis S, Babaliaros V. Aortic stenosis: A contemporary review. *The American journal of the medical sciences* 2012; 343 (6): 490-496.
17. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the national heart and lung and blood institute aortic stenosis working group. Executive summary: calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation* 2011 18;124(16):1783-91.
18. Heistad DD, Shanahan C, Demer LL. Introduction to the Compendium on calcific aortic valve disease. *Circulation research* 2013; 113(2): 176-178.
19. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013;127(1):143-52.
20. Rajamannan, NM. Calcific Aortic Stenosis: Lessons Learned From Experimental and Clinical Studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:162-168.
21. Alexopoulos A, Kaoukis A, Papadaki H, Pyrgakis V. Pathophysiologic mechanisms of calcific aortic stenosis. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* 2012; 6 (2): 71-80.
22. Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN et al . Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet* 2006 Sep 16;368(9540):1005-11.
23. Lindroos M, Kupari M, Heikkila J, and Tilvis R. Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly:an echocardiographic study of a random population sample. *J. Am. Coll. Cardiol* 1993; 21, 1220–1225.
24. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers* 2016 March 3; 2:16006.
25. Coffey S, Cox B. and Williams MJ. The prevalence, incidence, progression, and risks of aortic valve sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol* 2014; 63, 2852–2861.
26. Carabello BA, and Paulus WJ. Aortic stenosis. *Lancet* 2009; 373(9667): 956-966.
27. Crawford MH et al. Current Diagnosis and Treatment: Cardiology. 3rd ed. San Francisco: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2009.
28. Rosamond W, Flegal K, Friday G et al. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007; 115(5): e69-171.
29. Badheka AO, Singh V, Patel NJ et al. Trends of Hospitalizations in the United States from 2000 to 2012 of Patients >60 Years with Aortic Valve Disease. *Am J Cardiol* 2015 Jul 1;116(1):132-41.
30. Bossé Y, Mathieu P et al. Genomics: the next step to elucidate the etiology of calcific aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2008; 14:1327-1336.

31. Novaro GM, Griffin BP. Calcific aortic stenosis: another face of atherosclerosis? *Cleve Clin J Med* 2003 May;70(5):471-7.
32. Hutcheson JD, Aikawa E, and Merryman WD. Potential drug targets for calcific aortic valve disease. *Nat Rev Cardiol* 2014; 11(4): p. 218-31.
33. Rossi A, Faggiano P, Amado AE et al. Aortic valve sclerosis is a marker of atherosclerosis independently of traditional clinical risk factors. Analysis in 712 patients without ischemic heart disease. *Int J Cardiol* 2012;158(1):163-4.
34. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 1997 March 1;29(3):630-4.
35. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med* 2013 February 7;368(6):503-12.
36. Arsenault BJ, Boekholdt SM, Dube MP et al. Lipoprotein(a) levels, genotype, and incident aortic valve stenosis: a prospective Mendelian randomization study and replication in a case-control cohort. *Circ Cardiovasc Genet* 2014 June;7(3):304-10.
37. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2014 February 11;63(5):470-7.
38. Capoulade R, Chan KL, Yeang C et al. Oxidized Phospholipids, Lipoprotein(a), and Progression of Calcific Aortic Valve Stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2015 September 15;66(11):1236-46.
39. Smith JG. et al. Association of low-density lipoprotein cholesterol-related genetic variants with aortic valve calcium and incident aortic stenosis. *JAMA* 2014; 312, 1764–1771.
40. Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ et al. A randomized trial of intensive lipidlowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med* 2005 June 9;352(23):2389-97.
41. Rossebo AB, Pedersen TR, Boman K et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med* 2008 September 2;359(13):1343-56.
42. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A, Tam J. Effect of lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis. Results of the aortic stenosis progression observation: Measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation* 2010 January 4;121(2):306-14.
43. Laforest B, Andelfinger G. and Nemer M. Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve. *J. Clin. Invest* 2011; 121, 2876–2887.
44. Shi LM, et al. GATA5 loss of function mutations associated with congenital bicuspid aortic valve. *Int. J. Mol. Med* 2014; 33, 1219–1226.
45. Guauque-Olarte S, et al. Calcium signalings pathway genes RUNX2 and CACNA1C are associated with calcific aortic valve disease. *Circ. Cardiovasc. Genet* 2015; 8, 812–822.

46. Cripe L, Andelfinger G, Martin LJ, Shoener K. and Benson DW. Bicuspid aortic valve is heritable. *J. Am. Coll. Cardiol* 2004; 44, 138–143.
47. Anderson RH. Clinical anatomy of the aortic root. *Heart* 2000; 84(6): 670-673.
48. Kim H, Bergman R, Matyal R, Khabbaz KR, Mahmood F. Three-dimensional echocardiography and en face views of the aortic valve: technical communication. *JCVA* 2013; 27(2): 376-380.
49. Mackie BD, Subhi Ali Y. Aortic valve anatomy. Medscape Reference (29 May 2013). <http://emedicine.medscape.com/article/1922899-overview>.
50. Charitos EI, Sievers HH. Anatomy of the aortic root: implications for valve-sparing surgery. *Ann Cardiothorac Surg* 2013; 2(1):53-6.
51. Misfeld M and Sievers HH. Heart valve macro- and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007; 362(1484):1421-36.
52. Choo SJ, McRae G, Olomon JP et al. Aortic root geometry: Pattern of differences between leaflets and sinuses of Valsalva. *J Heart Valve Dis* 1999; 8:407-15.
53. Chen JH. and Simmons CA. Cell–matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues. *Circ. Res* 2011; 108, 1510–1524.
54. Taylor PM. Biological matrices and bionanotechnology. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 2007;362(1484):1313-20.
55. Leopold JA. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Circ Cardiovasc Interv* 2012 Aug 1;5(4):605-14.
56. Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation* 2008;118(18):1864-80.
57. Hinton RB and Yutzey KE. Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol* 2011; 73:29-46
58. Scott M and Vesely I. Aortic valve cusp microstructure: the role of elastin. *Ann Thorac Surg* 1995 Aug; 60 (2 Suppl): S391-4.
59. Taylor PM, Allen SP. and Yacoub MH. Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. *J. Heart Valve Dis* 2000 9, 150–158.
60. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI et al. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol* 2007;171(5):1407-18.
61. Wirrig EE and Yutzey KE. Conserved transcriptional regulatory mechanisms in aortic valve development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014 Apr;34(4):737-41.

62. Latif N, Sarathchandra P, Chester AH, Yacoub MH. Expression of smooth muscle cell markers and co-activators in calcified aortic valves. *Eur Heart J* 2015;36(21):1335-45.
63. Chen JH, Yip CY, Sone ED, Simmons CA. Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol* 2009;174(3):1109-19.
64. Arkady Rutkovskiy, Anna Malashicheva, Gareth Sullivan et al. Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc* 2017 Sep 14;6(9). pii: e006339.
65. Aikawa E, Whittaker P, Farber M et al. Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering. *Circulation* 2006 March 14;113(10):1344-52.
66. Weind KL, Ellis CG, Boughner DR et al. The aortic valve blood supply. *The Journal of heart valve disease* 2000; 9(1): 1-7; discussion 7-8.
67. Simmons CA. Aortic valve mechanics: an emerging role for the endothelium. *J Am Coll Cardiol* 2009 April 21;53(16):1456-8.
68. Davies PF, Passerini AG, Simmons CA. Aortic valve: Turning over a new leaf(let) in endothelial phenotypic heterogeneity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 August;24(8):1331-3.
69. Schoen FJ. Mechanisms of function and disease of natural and replacement heart valves. *Annu Rev Pathol* 2012; 7:161-83.
70. Damian Medici. Endothelial-Mesenchymal Transition in Regenerative Medicine. *Stem Cells Int* 2016; 2016: Article ID 6962801, 7 pages
71. Lincoln J and Yutzey KE. Molecular and developmental mechanisms of congenital heart valve disease. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011 Jun;91(6):526-34.
72. Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K et al. Chondromodulin-I maintains cardiac valvular function by preventing angiogenesis. *Nat Med* 2006 12:1151-9.
73. Cosmi JE, Kort S, Tunick PA et al. The risk of the development of aortic stenosis in patients with "benign" aortic valve thickening. *Arch Intern Med* 2002 November 11;162(20):2345-7.
74. Livanainen AM, Lindroos M, Tilvis R, Heikkila J, Kupari M. Natural history of aortic valve stenosis of varying severity in the elderly. *Am J Cardiol* 1996;78(1):97-101.
75. Garg V et al. Molecular genetics of aortic valve disease. *Current opinion in cardiology* 2006; 21(3): 180-184.
76. Kyndt F, Le Scouarnec S, Jaafar P et al. Genetic aspects of valvulopathies. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 2007; 100(12): 1013-1020.

77. Helske S et al. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol* 2007;18(5):483-91.
78. Bouchareb R, Boulanger MC, Fournier D et al. Mechanical strain induces the production of spheroid mineralized microparticles in the aortic valve through a RhoA/ROCK-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 67:49-59.
79. Johnson K, Pritzker K, Goding J, Terkeltaub R. The nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase isozyme PC-1 directly promotes cartilage calcification through chondrocyte apoptosis and increased calcium precipitation by mineralizing vesicles. *J Rheumatol* 2001; 28:2681-91.
80. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 July;87(13):5134-8.
81. Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Pena-Silva R, Heistad DD. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *J Am Coll Cardiol* 2008 September 2;52(10):843-50.
82. Abdelbaky A et al. Early aortic valve inflammation precedes calcification: a longitudinal FDG-PET/CT study. *Atherosclerosis* 2015; 238, 165-172.
83. Mohty D, Pibarot P, Despres JP et al. Association between plasma LDL particle size, valvular accumulation of oxidized LDL, and inflammation in patients with aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 January;28(1):187-93.
84. Cote C, Pibarot P, Despres JP et al. Association between circulating oxidised low- density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis. *Heart* 2008 September;94(9):1175-80.
85. Mathieu P, Boulanger MC. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease. *Can J Cardiol* 2014 September;30(9):982-93.
86. O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 April;16(4):523-32.
87. Olsson M, Thyberg J, Nilsson J et al. Presence of oxidized low-density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 May;19(5):1218-22.
88. Cote N, Mahmut A, Bosse Y et al. Inflammation is associated with the remodeling of calcific aortic valve disease, *Inflammation* 2013, vol. 36, no. 3, pp. 573-581.
89. Capoulade R, Clavel MA, Dumesnil JG et al. Impact of metabolic syndrome on progression of aortic stenosis: influence of age and statin therapy. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60:216-23.

90. Briand M, Lemieux I, Dumesnil JG et al. Metabolic syndrome negatively influences disease progression and prognosis in aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2229-36.
91. Byon CH, Javed A, Dai Q 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): 15319-15327.
92. Lassègue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 Apr;30(4):653-61.
93. Liberman M et al. Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2008; 28, 463–470.
94. Mahmut A, Boulanger MC, Fournier D et al. Lipoprotein lipase in aortic valve stenosis is associated with lipid retention and remodelling. *Eur J Clin Invest* 2013;43:570-8.
95. Derbali H, Bosse Y, Cote N et al. Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2. *Am J Pathol* 2010; 176:2638-45.
96. Song R et al. Biglycan induces the expression of osteogenic factors in human aortic valve interstitial cells via Toll-like receptor-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2012; 32, 2711–2720.
97. Tsimikas S and Witztum JL. The role of oxidized phospholipids in mediating lipoprotein (a) atherogenicity. *Curr. Opin. Lipidol* 2008; 19, 369–377.
98. Dube JB, Boffa MB, Hegele RA and Koschinsky ML. Lipoprotein (a): more interesting than ever after 50 years. *Curr. Opin. Lipidol* 2012; 23, 133–140.
99. Hakkinen T, Luoma JS, Hiltunen MO et al. Lipoprotein-associated phospholipase A (2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 December;19(12):2909-17.
100. Zalewski A and Macphee C. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 May;25(5):923-31.
101. Mahmut A, Boulanger MC, Hussein DE et al. Elevated expression of Lp-PLA2 in calcific aortic valve disease: implication for valve mineralization. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63:460-9.
102. Mahmut A, Mahjoub H, Boulanger MC et al. Lp-PLA2 is associated with structural valve degeneration of bioprostheses. *Eur. J. Clin. Invest* 2014; 44, 136–145.
103. Macphee CH, Nelson J, Zalewski A. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and its potential as a therapeutic target. *Curr Opin Pharmacol* 2006 April;6(2):154-61.

104. Vickers KC, Castro-Chavez F, Morrisett JD et al. Lyso-phosphatidylcholine induces osteogenic gene expression and phenotype in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2010 July;211(1):122-9.
105. Mohty D, Pibarot P, Despres JP et al. Age-related differences in the pathogenesis of calcific aortic stenosis: the potential role of resistin. *Int J Cardiol* 2010; 142:126-32.
106. Steiner I, Kasparova P, Kohout A, Dominik J. Bone formation in cardiac valves: a histopathological study of 128 cases. *Virchows Arch* 2007 June;450(6):653-7.
107. Otto CM et al. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994; 90(2): p. 844-53.
108. Bosses Y, Miqdad A, Fournier D et al. Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2:489-98.
109. Mathieu P, Arsenault BJ, Boulanger MC, Bossé Y and Koschinsky ML. Pathobiology of Lp(a) in calcific aortic valve disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2017 Oct;15(10):797-807.
110. Akat K, Borggreffe M, Kaden JJ. Aortic valve calcification: basic science to clinical practice. *Heart* 2009; 95(8): 616-623.
111. O'Brien KD. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 August;26(8):1721-8.
112. Ghaisas NK, Foley JB, O'Briain DS, Crean P, Kelleher D, Walsh M. Adhesion molecules in nonrheumatic aortic valve disease: endothelial expression, serum levels and effects of valve replacement. *J Am Coll Cardiol* 2000 December;36(7):2257-62.
113. Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg* 2001 February;75(2):457-65.
114. Kaden JJ, Kilic R, Sarikoc A et al. Tumor necrosis factor alpha promotes an osteoblast-like phenotype in human aortic valve myofibroblasts: a potential regulatory mechanism of valvular calcification. *Int J Mol Med* 2005 November; 16(5):869-72.
115. Hsu H, Shu HB, Pan MG and Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; 84, 299-308.
116. Lee HL, Woo KM, Ryoo HM and Baek JH. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2010; 391, 1087-1092.
117. Isoda K, Matsuki T, Kondo H, Iwakura Y and Ohsuzu F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist induces aortic valve disease in BALB/c mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2010; 30, 708-715.

118. Galeone A, Paparella D, Colucci S, Grano M, Brunetti G. The role of TNF- and TNF superfamily members in the pathogenesis of calcific aortic valvular disease. *ScientificWorldJournal* 2013; 2013:875363.
119. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R et al. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol* 2005 March; 14(2): 80-7
120. Arsenault BJ, Dubé MP, Brodeur MR, De Oliveira Moraes AB et al. Evaluation of links between high-density lipoprotein genetics, functionality, and aortic valve stenosis risk in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34:457-462.
121. Al-Aly Z, Shao JS, Lai CF et al. Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:2589-96.
122. Lai CF et al. TNFR1-activated reactive oxidative species signals up-regulate osteogenic Msx2 programs in aortic myofibroblasts. *Endocrinology* 2012; 153, 3897–3910.
123. West XZ et al. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature* 2010; 467, 972–976.
124. Zeng Q, Song R, Ao L, Xu D, Venardos N, Fullerton DA, Meng X. Augmented osteogenic responses in human aortic valve cells exposed to oxLDL and TLR4 agonist: a mechanistic role of Notch1 and NF-κB interaction. *PLoS One* 2014 May 8;9(5): e95400.
125. El Hussein D, Boulanger MC, Mahmut A et al. P2Y2 receptor represses IL-6 expression by valve interstitial cells through Akt: implication for calcific aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol* 2014;72C:146-56.
126. Mahler GJ, Farrar EJ, Butcher JT. Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:121-30.
127. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, and Penninger JM. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol. Med* 2006; 12, 17–25.
128. Kaden JJ et al. Receptor activator of nuclear factor κB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J. Mol. Cell. Cardiol* 2004, 36, 57–66.
129. Yoffe JR, Taylor DJ, and Woolley D. Mast-cell products and heparin stimulate the production of mononuclear-cell factor by cultured human monocyte/macrophages. *Biochem J* 1985; 230:83-8.
130. Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci US A* 1995 January 17;92(2):402-6.

131. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R et al. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* 2003 October; 170(2):205-11.
132. Jovinge S, Ares MP, Kallin B, Nilsson J. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 1996 December; 16(12): 1573-9.
133. Satta J, Oiva J, Salo T et al. Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis. *Ann Thorac Surg* 2003 September;76(3):681-8.
134. Qin X, Corriere MA, Matrisian LM, Guzman RJ. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2006 July;26(7): 1510-6.
135. Jian B, Jones PL, Li Q, Mohler ER, Schoen FJ, Levy RJ. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am J Pathol* 2001 July;159(1):321-7.
136. Mathieu P, Bouchareb R. and Boulanger MC. Innate and adaptive immunity in calcific aortic valve disease. *J. Immunol. Res* 2015, 851945.
137. Winchester R, Wiesendanger M, O'Brien W et al. Circulating activated and effector memory T cells are associated with calcification and clonal expansions in bicuspid and tricuspid valves of calcific aortic stenosis. *Journal of Immunology* 2011, vol. 187, no. 2, pp. 1006–1014.
138. Wu HD, Maurer MS, Friedman RA et al. The lymphocytic infiltration in calcific aortic stenosis predominantly consists of clonally expanded T cells, *The Journal of Immunology* 2007, vol. 178, no. 8, pp. 5329–5339,.
139. Wylie-Sears J, Aikawa E, Levine RA, Yang JH, Bischoff J. Mitral valve endothelial cells with osteogenic differentiation potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 Mar; 31(3):598-607.
140. Khosla S, and Eghbali-Fatourechi GZ. Circulating cells with osteogenic potential. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1068: 489-497.
141. Eghbali-Fatourechi GZ, Lamsam J, Fraser D et al. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *The New England journal of medicine* 2005; 352(19): 1959-1966.
142. Mohler ER, Kaplan FS, and Pignolo RJ . Boning-up on aortic valve calcification. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; 60(19): 1954-1955.
143. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007; 131(2): 324-336.
144. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C et al. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 2001 Mar 20; 103(11): 1522-1528.
145. Miller JD, Weiss RM, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circ Res* 2011 May 27;108(11):1392-412.

146. Caira FC, Stock SR, Gleason TG et al. Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *J Am Coll Cardiol* 2006 April 18;47(8): 1707-12.
147. Rajamannan NM. The role of Lrp5/6 in cardiac valve disease: LDL-density-pressure theory. *J Cell Biochem* 2011; 112(9):2222-2229.
148. Chen JH, Chen WL, Sider KL, Yip CY, Simmons CA. beta-catenin mediates mechanically regulated, transforming growth factor-beta 1-induced myofibroblast differentiation of aortic valve interstitial cells. *Arterioscler Thromb Vase Bio* 2011 March;31(3):590-7.
149. Helske S, Lindstedt KA, Laine M et al. Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol* 2004 November 2;44(9):1859-66.
150. O'Brien KD, Shavelle DM, Caulfield MT et al. Association of angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma. *Circulation* 2002 October 22;106(17):2224-30.
151. O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD et al. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 1995 October 15;92(8):2163-8.
152. Srivatsa SS, Harrity PJ, Maercklein PB et al. Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J Clin Invest* 1997 March 1;99(5):996-1009.
153. Satta J, Melkko J, Pollanen R et al. Progression of human aortic valve stenosis is associated with tenascin-C expression. *J Am Coll Cardiol* 2002 January 2;39(1):96-101.
154. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 2003; 107(17): 2181-2184.
155. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 2006 November 10;99(10): 1044-59.
156. Kaden JJ et al. Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis. *J Heart Valve Dis* 2004. 13(4): p. 560-6.
157. Rajamannan, NM et al. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced calcification in the aortic valves via the Lrp5 receptor pathway. *Circulation* 2005. 112(9 Suppl): p. I229-34.
158. Miller JD, Weiss RM, Serrano KM et al. Evidence for active regulation of proosteogenic signaling in advanced aortic valve disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:2482–2486.
159. Ducharme V, Guauque-Olarte S, Gaudreault N et al. NOTCH1 genetic variants in patients with tricuspid calcific aortic valve stenosis. *J Heart Valve Dis* 2013 Mar;22(2):142-9.

160. High FA, and Epstein JA. The multifaceted rôle of Notch in cardiav development and disease. *Nat Rev Genet* 2008; 285 (32): 24381-24387.
161. Penton AL, Leonard LD, Spinner NB. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23 (4): 450-457.
162. Guruharsha, K.G., M.W. Kankel, and S. Artavanis-Tsakonas, The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* 2012. 13(9): p. 654-66.
163. Acharya A, Hans CP, Koenig SN et al. Inhibitory rôle of Notch1 in calcific aortic valve disease. *Plos one* 2011; 6 (11): e27743.
164. Nigam V and Srivastava D. Notchl represses osteogenic pathways in aortic valve cells. *J Mol Cell Cardiol* 2009 December;47(6):828-34.
165. Luna-Zurita L, Prados B, Grego-Bessa J et al. Integration of a notch-dependent mesenchymal gene program and bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *J Clin Invest* 2010; 120:3493–3507.
166. Hofbauer LC and Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004; 292:490–5.
167. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89(2): 309-319.
168. Tintut Y and Demer LL. Role of Osteoprotegerin and Its Ligands and Competing Receptors in Atherosclerotic Calcification. *J Investig Med* 2006; 54: 395–401.
169. Teitelbaum SL and Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003; 4:638–49.
170. Weiss RM, Lund DD, Chu Y et al. Osteoprotegerin inhibits aortic valve calcification and preserves valve function in hypercholesterolemic mice. *PloS One* 2013; 8(6): e65201.
171. Towler DA. Molecular and Cellular Aspects of Calcific Aortic Valve Disease. *Circ Res* 2013; 113:198-208.
172. Lai CF, Shao Branchetti, R. Sainger, P. Poggio et al., “Antioxidant enzymes reduce DNA damage and early activation of valvular interstitial cells in aortic valve sclerosis,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2013, vol. 33, no. 2, pp. e66–e74.
173. Bertazzo S, Gentleman E, Cloyd KL, Chester AH, Yacoub MH, Stevens MM. Nanoanalytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification. *Nat Mater* 2013 June;12(6):576-83.
174. Linefsky JP et al. Association of serum phosphate levels with aortic valve sclerosis and annular calcification: the cardiovascular health study. *J Am Coll Cardiol* 2011. 58(3): p. 291-7.

175. Mathieu P, Voisine P, Pepin A et al. Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis* 2005; 14:353-7.
176. Foley RN, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra PA. Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. *J Am Soc Nephrol* 2009 February;20(2):397-404.
177. Dhingra R, Sullivan LM, Fox CS et al. Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch Intern Med* 2007 May 14;167(9):879-85.
178. El Husseini D et al., High expression of the Pi-transporter SLC20A1/Pit1 in calcific aortic valve disease promotes mineralization through regulation of Akt-1. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e53393.
179. Yip CY, Chen JH, Zhao R, Simmons CA. Calcification by valve interstitial cells is regulated by the stiffness of the extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:936 –942.
180. Stefan CS, Jansen, and M Bollen. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(10): p. 542-50.
181. Yegutkin GG. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008 May;1783(5):673-94.
182. Orriss IR, Utting JC, Brandao-Burch A et al. Extracellular nucleotides block bone mineralization in vitro: evidence for dual inhibitory mechanisms involving both P2Y2 receptors and pyrophosphate. *Endocrinology* 2007 September;148(9):4208- 16.
183. Côte N, El Husseini D, Pepin A et al. ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52: 1191-202.
184. Côté N, El Husseini D, Pepin A et al. Inhibition of ectonucleotidase with ARL67156 prevents the development of calcific aortic valve disease in warfarin-treated rats. *Eur J Pharmacol* 2012 August 15;689(1-3):139-46.
185. Mathieu P. Pharmacology of ectonucleotidases: Relevance for the treatment of cardiovascular disorders. *Eur J Pharmacol* 2012; 696(1-3):1–4.
186. Mahmut A, Boulanger MC, Bouchareb R, Hadji F, Mathieu P. Adenosine derived from ectonucleotidases in calcific aortic valve disease promotes mineralization through A2a adenosine receptor. *Cardiovasc Res* 2015 Apr 1;106(1):109-20.
187. Bouchareb R et al. Carbonic anhydrase XII in valve interstitial cells promotes the regression of calcific aortic valve stenosis. *J. Mol. Cell. Cardiol* 2015; 82,104–115.
188. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 2003; 361:827-33.

189. Schafer C, Heiss A, Schwarz A et al. The serum protein alpha 2-Heremans- Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 2003 August;112(3):357-66.
190. Ix JH, Chertow GM, Shlipak MG et al. Association of fetuin-A with mitral annular calcification and aortic stenosis among persons with coronary heart disease: data from the Heart and Soul Study. *Circulation* 2007 May 15;115(19):2533-9.
191. Kaden JJ, Reinohl JO, Blesch B et al. Systemic and local levels of fetuin-A in calcific aortic valve stenosis. *Int J Mol Med* 2007 August;20(2):193-7.
192. Mohty D, Côté N, Pibarot P et al. Reduced fetuin a serum level is associated with faster progression and increased valvular calcification in elderly patients with aortic stenosis. *J Clin and Exp Cardiol* 2011; 2:147.
193. O'Young J, Liao Y, Xiao Y et al. Matrix Gla protein inhibits ectopic calcification by a direct interaction with hydroxyapatite crystals. *J.Am.Chem.Soc* 2011 November 16;133(45):18406-12.
194. Capoulade R et al. Circulating levels of matrix gla protein and progression of aortic stenosis: a substudy of the Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Can J Cardiol*, 2014. 30(9): p.1088-95.
195. Doyon M, Mathieu P, and Moreau P. Decreased expression of gamma-carboxylase in diabetes-associated arterial stiffness: impact on matrix Gla protein. *Cardiovasc Res* 2013. 97(2): p. 331-8.
196. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002 February 8;277(6):4388-94.
197. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO et al. ACC Guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary. *Circulation* 2014; 129:2440-2492.
198. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J et al. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *J Am Soc Echocardiogr* 2009;22(1):1-23.
199. Pibarot P and Dumesnil JG. Improving assessment of aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2012;60(3):169-80.
200. Lung B, Gohlke-Barwolf C, Tornos P et al. Recommendations on the management of the asymptomatic patients with valvular heart disease. *Eur Heart J* 2002; 23:1252-66.
201. Beckmann E et al. Insights into the Use of Biomarkers in Calcific Aortic Valve Disease. *J Heart Valve Dis* 2010; 4:441-452.
202. Lindman BR, Bonow RO, Otto CM. Current management of calcific aortic stenosis. *Circulation research* 2013; 113(2): 223-237.
203. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO et al. AHA Guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary. *Circulation* 2014; 129:2440-2492.

204. Carabello BA. Aortic valve replacement should be operated on before symptom onset. *Circulation* 2012 July 3;126(1):112-7.
205. Kvidal P, Bergstrom R, Horte LG, Stahle E. Observed and relative survival after aortic valve replacement. *J Am Coll Cardiol* 2000 March 1;35(3):747-56.
206. Lee R, Li S, Rankin JS, O'Brien SM et al. Fifteen-year outcome trends for valve surgery in North America. *The Annals of thoracic surgery* 2011; 91(3): 677-684; discussion p 684.
207. Ruel M, Chan V, Bedard P et al. Very long-term survival implications of heart valve replacement with tissue versus mechanical prostheses in adults <60 years of age. *Circulation* 2007 September 11;116(11 Suppl): I294-I300.
208. Shavelle DM, Takasu J, Budoff MJ, Mao S, Zhao XQ, O'Brien KD. HMG CoA reductase inhibitor (statin) and aortic valve calcium. *Lancet* 2002 March 30;359(9312):1125-6.
209. Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M et al. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve. *Circulation* 2002; 105(22): 2660-2665.
210. Aronow WS, Ahn C, Kronzon I, Goldman ME. Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons. *Am J Cardiol* 2001; 88:693-695.
211. Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL et al. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation* 2001; 104:2205- 2209.
212. Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL et al. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:554-561.
213. Torzewski M, Ravandi A, Yeang C et al. Lipoprotein(a)-associated molecules are prominent components in plasma and valve leaflets in calcific aortic valve stenosis. *JACC Basic Transl Sci* 2017; 2:335-340.
214. Arishiro K, Hoshiga M, Negoro N et al. Angiotensin receptor-1 blocker inhibits atherosclerotic changes and endothelial disruption of the aortic valve in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 49(13): 1482-1489.
215. O'Brien KD, Probstfield JL, Caulfield MT et al. Angiotensin converting enzyme inhibitors and change in aortic valve calcium. *Archives of internal medicine* 2005; 165(8): 858-862.
216. Rajamannan NM, Subramaniam M, Stock SR et al. Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve. *Heart* 2005;91(6):806-10.
217. Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, Young SG, and Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2006;114(19):2065-9.

218. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* 2007;116(24):2841-50.
219. Sider KL, Blaser MC, Simmons CA. Animal models of calcific aortic valve disease. *Int J Inflam* 2011; 2011:364310.
220. Guerraty M and Mohler ER. Models of aortic valve calcification. *Journal of Investigative Medicine* 2007, vol. 55, no. 6, pp. 278–283.
221. S. Fazio and M. F. Linton, “Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis,” *Frontiers in Bioscience* 2001, vol. 6, pp. D515– D525.
222. Getz GS, and Reardon CA. Diet and murine atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006;26(2):242-9.
223. Miller JD, Weiss RM, Serrano KM et al. Lowering plasma cholesterol levels halts progression of aortic valve disease in mice. *Circulation* 2009;119(20):2693-701.
224. Chester AH, El-Hamamsy I, Butcher JT, Latif N, Bertazzo S, Yacoub MH. The living aortic valve: From molecules to function. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2014;2014:52-77.
225. Tanaka K, Sata M, Fukuda D et al. Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Am Coll Cardiol* 2005 July 5;46(1):134-41.
226. Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D et al. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease. *Circulation* 2007;115(3):377-86.
227. Le Quang K, Bouchareb R, Lachance D et al. Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014 October;34(10):2283-91.
228. Rajamannan NM. Oxidative-mechanical stress signals stem cell niche mediated Lrp5 osteogenesis in eNOS(-/-) null mice. *J Cell Biochem* 2012 May; 113(5): 1623-34.
229. Prié D, Ureña Torres P, Friedlander G. Fibroblast Growth Factor 23-Klotho: a new axis of phosphate balance control. *Med Sci* 2009 May;25(5):489-95.
230. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997 November 6;390(6655):45-51.
231. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 2004 Feb;113(4):561-8.
232. Bacchetta J, Cochat P, Salusky IB. FGF23 and Klotho: the new cornerstones of phosphate/calcium metabolism. *Arch Pediatr* 2011 Jun;18(6):686-95.

233. Sitara D, Razzaque MS, Hesse M et al. Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in PheX-deficient mice. *Matrix Biol* 2004 November;23(7):421-32.
234. André-Fouët X, Ben lian P, Baereziat G, Bernard S, and Farnier M. Métabolisme des lipides dans l'organisme, p. 30-56. In Elsevier (ed.), 2004, Dyslipidémie et athérogenèse.
235. Miller NE. Plasma lipoproteins, lipid transport, and atherosclerosis: recent developments. *J Clin Pathol* 1979 Jul; 32(7): 639–650.
236. Wasan KM, Brocks DR, Lee SD, Sachs-Barrable K, Thornton SJ. Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2008 Jan;7(1):84-99.
237. Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW Jr, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci* 2009 Jun 29;5(5):474-88.
238. Redgrave TG. Chylomicrons. London : Arnold, Hodder Headline Group, 1999 31-54.
239. Pownall H. and Gotto, A M. Structure and dynamics of human plasma lipoproteins, New York : *Oxford University Press Inc* 1999; 3-15.
240. Alonzi T, Mancone C et al. Elucidation of lipoprotein particles structure by proteomic analysis. *Expert Rev Proteomics* 2008; 5(1): 91-104.
241. Ginsberg HN, Dixon JL, and Goldberg IJ. VLDL/LDL cascade system: assembly, secretion and intravascular metabolism of apoprotein Bcontaining lipoproteins, London : Arnold, Hodder Headline Group, 1999 55-70.
242. Berneis KK and Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J.Lipid Res* 2002; 43:1363-1379.
243. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S et al. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 1997 January 7;95(1):69-75.
244. St Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR et al. Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up data from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 March;25(3):553-9.
245. Lamarche B, St Pierre AC, Ruel JL et al. A prospective, population-based study of low density lipoprotein particle size as a risk factor for ischemia heart disease in men. *Can J.Cardiol* 2001; 17:859-865.
246. Austin MA, King MC, Vranizan KM, and Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990; 82:495-506.
247. Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B et al. Differential uptake of proteoglycan-selected subfractions of low density lipoprotein by human macrophages. *J.Lipid Res* 1990; 31:1387-1398.

248. Burnett JR and Hooper AJ. Common and rare gene variants affecting plasma LDL cholesterol. *Clin Biochem Rev* 2008 Feb;29(1):11-26.
249. Yilmaz MB, Guray U, Guray Y et al. Lipid profile of patients with aortic stenosis might be predictive of rate of progression. *Am Heart J* 2004 May;147(5):915-8.
250. Mathieu P, Pibarot P, Després JP. Metabolic syndrome: the danger signal in atherosclerosis. *Vascular Health and Risk Management* 2006;2(3):285-302.
251. Tribble DL, Holl LG, Wood PD, Krauss RM. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* 1992 April;93(3): 189-99.
252. Nadlonek NA, Lee JH, Weyant MJ, Meng X, Fullerton DA. Ox-LDL induces PiT-1 expression in human aortic valve interstitial cells. *J Surg Res* 2013; 184:6-9.
253. Côté N, Pibarot P, Pepin A et al. Oxidized low-density lipoprotein, angiotensin II and increased waist circumference are associated with valve inflammation in prehypertensive patients with aortic stenosis. *Int J Cardiol* 2009 June 12;145 (3):444-9.
254. Pohle K, Maffert R, Ropers D et al. Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation* 2001 October 16;104(16):1927-32.
255. Osterud B, and Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 2003 October;83(4): 1069-112.
256. Mashima R, Witting PK, Stocker R. Oxidants and antioxidants in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2001 August; 12(4):411-8.
257. Brown MS, and Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:223-61.
258. Sissel Lund-Katz and Michael C. Phillips. High Density Lipoprotein Structure–Function and Role in Reverse Cholesterol Transport. *Subcell Biochem* 2010; 51: 183–227.
259. von Eckardstein, A, Hersberger M, Rohrer L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005 March; 8(2): 147-52.
260. von Eckardstein A, Huang Y, and Assmann G. Physiological rôle and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr. Opin. LipidoL* 1994; 5:404-416.
261. Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. In: Betteridge DJ, Illingworth DR, Shepherd J, editors. Lipoproteins in health and disease. London: Arnold, Hodder Headline Group, 1999: 71-85.
262. Annema W, and Tietge UJ. Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies. *Nutr Metab* 2012; 9(1): 25.

263. Yvan-Charvet L, Wang N et al. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(2): 139-143.
264. Mackness B and Mackness M. Anti-inflammatory properties of paraoxonase-1 in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 2010; 660:143-51.
265. Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol* 2011 April;8(4):222-32.
266. Nofer JR, Kehrel B, Fobker M et al. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002 March;161(1):1-16.
267. Calabresi L, Rossoni G, Gomaschi M, Sisto F, Berti F, Franceschini G. High-density lipoproteins protect isolated rat hearts from ischemia-reperfusion injury by reducing cardiac tumor necrosis factor-alpha content and enhancing prostaglandin release. *Circ Res* 2003 February 21;92(3):330-7.
268. Hyka N, Dayer JM, Modoux C et al. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood* 2001 April 15;97(8):2381-9.
269. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 Nov;15(11):1987-94.
270. Parhami F, Basseri B, Hwang J, Tintut Y, Demer LL. High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells. *Circ Res* 2002; 91:570-6.
271. Jaakko IL, Petri TK, Matti J et al. High-density lipoproteins (HDL) are present in stenotic aortic valves and may interfere with the mechanisms of valvular calcification. *Atherosclerosis* 2011; 219 538-544.
272. Audet A, Cote N, Couture C et al. Amyloid substance within stenotic aortic valves promotes mineralization. *Histopathology* 2012; 61:610-9.
273. Trapeaux J, Busseuil D, Shi Y et al. Improvement of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic therapy is associated with decreased aortic root and valve remodelling in mice. *Br J Pharmacol* 2013; 169:1587-99.
274. Speidl WS, Cimmino G, Ibanez B et al. Recombinant apolipoprotein A-I Milano rapidly reverses aortic valve stenosis and decreases leaflet inflammation in an experimental rabbit model. *Eur Heart J* 2010 March 19.
275. Serman LJ and Breeckenridge WC. Isolation and partial characterization of apolipoprotein(a) from human lipoprotein(a). *Biochem Cell Biol* 1986; 64: 999-1009.
276. Koschinsky ML and Boffa MB. Lipoprotein(a): an important cardiovascular risk factor and a clinical conundrum. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2014 Dec;43(4):949-62.

277. Fless GM, ZumMallen ME, Scanu AM. Physicochemical properties of apolipoprotein (a) and lipoprotein(a) derived from the dissociation of human plasma lipoprotein (a). *J Biol Chem* 1986; 261:8712–8.
278. Koschinsky ML, Cote GP, Gabel BR, et al. Identification of the cysteine residue in apolipoprotein(a) that mediates extracellular coupling with apolipoprotein B- 100. *J Biol Chem* 1993; 268:19819–25.
279. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ et al. cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987; 330:132–7.
280. Gabel BR and Koschinsky MI. Analysis of the proteolytic activity of a recombinant form of apolipoprotein(a). *Biochemistry*, 1995, 34(48): 15777-15784.
281. van der Hoek YY, Wittekoek ME, Beisiegel U et al. The apolipoprotein(a) kringle IV repeats which differ from the major repeat kringle are present in variably sized isoforms. *Hum Mol Genet* 1993; 2:361–6.
282. Marcovina SM, Albers JJ, Wijsman E et al. Differences in Lp[a] concentrations and apo[a] polymorphs between black and white Americans. *J Lipid Res* 1996; 37:2569–85.
283. Koschinsky ML, Beisiegel U, Henne-Bruns D, Eaton DL, Lawn RM. Apolipoprotein(a) size heterogeneity is related to variable number of repeat sequences in its mRNA. *Biochemistry* 1990 January 23;29(3):640-4.
284. Lackner C, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein(a). *Hum Mol Genet* 1993; 2:933–40.
285. Marcovina SM, Gaur VP, Albers JJ. Biological variability of cholesterol, triglyceride, low- and high-density lipoprotein cholesterol, lipoprotein(a), and apolipoproteins A-I and B. *Clin Chem* 1994;40:574–8.
286. Utermann G. Genetic architecture and evolution of the lipoprotein(a) trait. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10:133–41
287. Austin MA, Sandholzer C, Selby JV, Newman B, Krauss RM, Utermann G. Lipoprotein(a) in women twins: heritability and relationship to apolipoprotein(a) phenotypes. *Am J Hum Genet* 1992 October;51(4):829-40.
288. Kronenberg F and Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Intern Med* 2013; 273:6–30.
289. IBC 50K CAD Consortium. Large-scale gene-centric analysis identifies novel variants for coronary artery disease. *PLoS Genet* 2011;7: e1002260.
290. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, et al. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA* 2009; 301:2331–9.
291. Clarke R, Peden JF, Hopewell JC et al. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. *N Engl J Med* 2009; 361:2518–28

292. Rader DJ, Cain W, Ikewaki K et al. The inverse association of plasma lipoprotein(a) concentrations with apolipoprotein(a) isoform size is not due to differences in Lp(a) catabolism but to differences in production rate. *J Clin Invest* 1994; 93:2758–2763.
293. Devedjian JC1, George M, Casellas A et al. Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in beta cells develop type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2000 Mar;105(6):731-40.
294. Nordestgaard BG, Langsted A. Lipoprotein (a) as a cause of cardiovascular disease: insights from epidemiology, genetics, and biology. *J Lipid Res*. 2016 Nov;57(11):1953-1975.
295. Lanktree MB, Anand SS, Yusuf S et al. Comprehensive analysis of genomic variation in the LPA locus and its relationship to plasma lipoprotein(a) in South Asians, Chinese, and European Caucasians. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3:39–46.
296. Hoover-Plow J and Huang M. Lipoprotein(a) metabolism: potential sites for therapeutic targets. *Metabolism* 2013 Apr;62(4):479-91.
297. Chennamsetty I, Claudel T, Kostner KM et al. Farnesoid X receptor represses hepatic human APOA gene expression. *J Clin Invest* 2011 September;121(9):3724-34.
298. Cain WJ, Millar JS, Himebauch AS et al. Lipoprotein [a] is cleared from the plasma primarily by the liver in a process mediated by apolipoprotein [a]. *J Lipid Res* 2005; 46:2681–91.
299. Tam SP, Zhang X, Koschinsky ML. Interaction of a recombinant form of apolipoprotein [a] with human fibroblasts and with the human hepatoma cell line HepG2. *J Lipid Res* 1996; 37:518–33.
300. Romagnuolo R, Scipione CA, Boffa MB, Marcovina SM, Seidah NG, Koschinsky ML. Lipoprotein(a) catabolism is regulated by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 through the low-density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 2015 May 1;290(18):11649-62.
301. Desai NR, Kohli P, Giugliano RP et al. AMG145, a monoclonal antibody against proprotein convertase subtilisin kexin type 9, significantly reduces lipoprotein(a) in hypercholesterolemic patients receiving statin therapy: an analysis from the LDL-C assessment with proprotein convertase subtilisin kexin type 9 monoclonal antibody inhibition combined with statin therapy (LAPLACE)-thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 57 trial. *Circulation* 2013; 128:962–9.
302. Sharma M, Redpath GM, Williams MJ, McCormick SP. Recycling of Apolipoprotein(a) After PlgRKT-Mediated Endocytosis of Lipoprotein(a). *Circ Res* 2017; 120:1091- 1102.
303. Lamon-Fava S, Diffenderfer MR, Marcovina SM. Lipoprotein(a) metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2014 Jun;25(3):189-93.
304. Kronenberg F, Utermann G, Dieplinger H. Lipoprotein(a) in renal disease. *Am J Kidney Dis* 1996; 27:1–25.

305. Yang XP, Amar MJ, Vaisman B et al. Scavenger receptor-BI is a receptor for lipoprotein(a). *J Lipid Res* 2013; 54:2450–7.
306. Alexandros D, Tselepis. Oxidized phospholipids and lipoprotein-associated phospholipase A2 as important determinants of Lp(a) functionality and pathophysiological role. *The Journal of Biomedical Research* 2017; 31(00):1-9.
307. Bergmark C, Dewan A, Orsoni A et al. A novel function of lipoprotein [a] as a preferential carrier of oxidized phospholipids in human plasma. *J Lipid Res* 2008; 49:2230–9.
308. Taleb A, Witztum JL, Tsimikas S. Oxidized phospholipids on apolipoprotein B-100 (OxPL/apoB) containing lipoproteins: a biomarker predicting cardiovascular disease and cardiovascular events. *Biomarkers Med* 2011; 5:673–94.
309. Maceler Aldrovandi and Valerie B. O'Donnell. Oxidized PLs and Vascular Inflammation. *Curr Atheroscler Rep* 2013; 15:323.
310. Bochkov VN, Oskolkova OV, Birukov KG et al. Generation and Biological Activities of Oxidized Phospholipids. *Antioxidants Redox Signaling* 2010 Apr 15; 12(8): 1009-1059.
311. Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 2010 Jul 1;13(1):39-75.
312. Watson AD, Leitinger N, Navab M et al. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem* 1997; 272(21): 13597-13607.
313. Yeang C, Wilkinson MJ, Tsimikas S. Lipoprotein(a) and oxidized phospholipids in calcific aortic valve stenosis. *Curr Opin Cardiol* 2016 Jul;31(4):440-50
314. Tsimikas S, Lau HK, Han K-R et al. Percutaneous Coronary Intervention Results in Acute Increases in Oxidized Phospholipids and Lipoprotein(a). Short-Term and Long-Term Immunologic Responses to Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Circulation* 2004; 109(25): 3164-3170.
315. Leibundgut G, Scipione C, Yin H et al. Determinants of binding of oxidized phospholipids on apolipoprotein (a) and lipoprotein (a). *J Lipid Res* 2013 October;54(10):2815-30.
316. Hughes SD, Lou XJ, Ighani S et al. Lipoprotein(a) vascular accumulation in mice. In vivo analysis of the role of lysine binding sites using recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 1997; 100:1493–500.
317. Kochl S, Fresser F, Lobentanz E et al. Novel interaction of apolipoprotein(a) with  $\beta$ -2 glycoprotein I mediated by the kringle IV domain. *Blood*, 1997, 90(4): 1482-1489.
318. Leibundgut G, Arai K, Orsoni A et al. Oxidized phospholipids are present on plasminogen, affect fibrinolysis, and increase following acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59:1426–1437.

319. Rao F, Schork AJ, Maihofer AX et al. Heritability of biomarkers of oxidized lipoproteins: twin pair study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35:1704– 1711.
320. Arai K, Orsoni A, Mallat Z et al. Acute impact of apheresis on oxidized phospholipids in patients with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2012; 53:1670–1678.
321. Tsimikas S, Viney NJ, Hughes SG et al. Antisense therapy targeting apolipoprotein(a): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 study. *Lancet* 2015; 386:1472–1483.
322. Yeang C, Hung MY, Byun YS et al. Effect of therapeutic interventions on oxidized phospholipids on apolipoprotein B100 and lipoprotein(a). *J Clin Lipidol* 2016; 10:594–603.
323. Sotirios Tsimikas and Joseph LW. The role of oxidized phospholipids in mediating lipoprotein(a) atherogenicity. *Current Opinion in Lipidology* 2008; 19:369–377.
324. Pillarisetti S, Paka L, Obunike JC et al. Subendothelial retention of lipoprotein (a). Evidence that reduced heparan sulfate promotes lipoprotein binding to subendothelial matrix. *J Clin Invest* 1997; 100:867–874.
325. O. S. Descamps. La lipoprotéine (a) renaissance d'un facteur de risque cardiovasculaire. *louvain med* 2015; 134 (7): 349-360.
326. Hung MY, Witztum JL, Tsimikas S. New therapeutic targets for calcific aortic valve stenosis: the lipoprotein(a)-lipoprotein-associated phospholipase A2-oxidized phospholipid axis. *J Am Coll Cardiol* 2014 Feb 11;63(5):478-80.
327. Tsimikas S, Mallat Z, Talmud PJ et al. Oxidation-specific biomarkers, lipoprotein(a), and risk of fatal and nonfatal coronary events. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56:946–955.
328. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z et al. A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem* 2002; 277(41): 38517-38523.
329. Ahmadi N, Tsimikas S, Hajsadeghi F et al. Relation of oxidative biomarkers, vascular dysfunction, and progression of coronary artery calcium. *Am J Cardiol* 2010; 105:459–466.
330. Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW et al. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:360–370.
331. Bochkov VN. Inflammatory profile of oxidized phospholipids. *Thromb Haemost* 2007; 97(3): 348-354.
332. Zimman A, Mouillesseaux KP, Le T et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 plays a role in the activation of aortic endothelial cells by oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(2): 332-338.

333. Seimon TA, Nadolski MJ, Liao X et al. Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* 2010; 12:467–82.
334. Berliner JA and Gharavi NM. Endothelial cell regulation by phospholipid oxidation products. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(2): 119-123.
335. Wiesner P, Tafelmeier M, Chittka D et al. MCP-1 binds to oxidized LDL and is carried by lipoprotein(a) in human plasma. *J Lipid Res* 2013; 54:1877–83.
336. Kamstrup PR, Hung MY, Witztum JL, Tsimikas S, Nordestgaard BG. Oxidized Phospholipids and Risk of Calcific Aortic Valve Disease: The Copenhagen General Population Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017 August;37(8):1570-8.
337. Su X, Ao L, Shi Y et al. Oxidized low density lipoprotein induces bone morphogenetic protein-2 in coronary artery endothelial cells via Toll-like receptors 2 and 4. *J Biol Chem* 2011; 286:12213–12220.
338. Goettsch C, Rauner M, Hamann C et al. Nuclear factor of activated T cells mediates oxidised LDL-induced calcification of vascular smooth muscle cells. *Diabetologia* 2011; 54:2690–2701.
339. Liao L, Zhou Q, Song Y et al. Ceramide mediates Ox-LDL-induced human vascular smooth muscle cell calcification via p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *PLoS One* 2013; 8:1–10.
340. Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA et al. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2117– 2124.
341. Morony S, Tintut Y, Zhang Z et al. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in ldlr<sup>(-/-)</sup> mice. *Circulation* 2008; 117:411–420.
342. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:509–519.
343. Yang X, Fullerton DA, Su X et al. Pro-osteogenic phenotype of human aortic valve interstitial cells is associated with higher levels of Toll-like receptors 2 and 4 and enhanced expression of bone morphogenetic protein 2. *J Am Coll Cardiol* 2009 February 10;53(6):491-500.
344. Vongpromek R, Bos S, Ten Kate GJ et al. Lipoprotein(a) levels are associated with aortic valve calcification in asymptomatic patients with familial hypercholesterolaemia. *J Intern Med* 2015; 278: 166–73.
345. Tselepis AD and Chapman MJ. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atherosclerosis* 2002; Suppl 3(4): 57-68.
346. Macphee CH, Moores KE, Boyd HF et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the

- oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J* 1999 March 1;338 (2):479-87.
347. Aiyar N, Disa J, Ao Z et al. Lysophosphatidylcholine induces inflammatory activation of human coronary artery smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 2007 January;295(1-2):113-20.
348. Liu SY, Lu X, Choy S et al. Alteration of lysophosphatidylcholine content in low density lipoprotein after oxidative modification: relationship to endothelium dependent relaxation. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1476–1481.
349. Wu R, Huang YH, Elinder LS, Frostegård J. Lysophosphatidylcholine is involved in the antigenicity of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:626–630.
350. Nakanaga K, Hama K, Aoki J. Autotaxin—an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem* 2010; 148:13–24.
351. Umezu-Goto M, Kishi Y, Taira A et al. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 2002 July 22;158(2):227-33.
352. Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res* 2014;55(7):1192-214.
353. Ming Quan, Jiu-jie Cui, Xiao Feng and Qian Huang. The critical role and potential target of the autotaxin/lysophosphatidate axis in pancreatic cancer. *Tumour Biol* 2017 Mar;39(3):1010428317694544.
354. Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ et al. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 1992; 267: 2524-2529.
355. Tokumura, A et al. Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. *Biochim Biophys Acta* 1986; 875(1): p.31-8.
356. Tokumura, A et al. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem*, 2002; 277(42): p. 39436-42.
357. Federico L, Jeong KJ, Vellano CP et al. Autotaxin, a lysophospholipase D with pleomorphic effects in oncogenesis and cancer progression. *J Lipid Res* 2016; 57: 25–35.
358. Hausmann J, Perrakis A, Moolenaar HW. Structure–function relationships of autotaxin, a secreted lysophospholipase D. *Adv Biol Regul* 2013 Jan;53(1):112-7.
359. Hausmann J, Kamtekar S, Christodoulou E et al. Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. *Nature structural & molecular biology* 2011; 18: 198-204.

360. Nishimasu H, Okudaira S, Hama K et al. Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nature structural & molecular biology* 2011; 18: 205-212.
361. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology* 1996; 12: 697-715.
362. Hashimoto T, S Okudaira , K Igarashi , K.Hama , Y. Yatomi , and J. Aoki . 2012. Identification and biochemical characterization of a novel autotaxin isoform, ATXdelta, with a four-amino acid deletion. *J. Biochem.* 151: 89 – 97.
363. Fulkerson Z, Wu T, Sunkara M et al. Binding of autotaxin to integrins localizes lysophosphatidic acid production to platelets and mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286: 34654-34663.
364. Koh E et al. Site-directed mutations in the tumor-associated cytokine, autotaxin, eliminate nucleotide phosphodiesterase, lysophospholipase D, and motogenic activities. *Cancer Res* 2003; 63(9): p. 2042-5.
365. Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 2001; 276: 1361-1368.
366. Gijsbers R et al. The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site. *FEBS Lett* 2003; 538(1-3): p. 60-4.
367. Jansen S, Andries M, Derua R et al. Domain interplay mediated by an essential disulfide linkage is critical for the activity and secretion of the metastasis-promoting enzyme autotaxin. *The Journal of biological chemistry* 2009; 284: 14296-14302.
368. Cimpean A, Stefan C, Gijsbers R, Stalmans W and Bollen M. Substrate-specifying determinants of the nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases NPP1 and NPP2. *Biochem J* 2004; 381(Pt 1): p. 71-7.
369. Gijsbers, R, Ceulemans H and Bollen M. Functional characterization of the non-catalytic ectodomains of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP1. *Biochem J* 2003 Apr 15;371(Pt 2):321-30.
370. Dennis J, White MA, Forrest AD et al. Phosphodiesterase-Ialpha/autotaxin's MORFO domain regulates oligodendroglial process network formation and focal adhesion organization. *Mol Cell Neurosci* 2008 Feb;37(2):412-24.
371. Lewit-Bentley A, and Rety S. EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10: 637-643.
372. Lee J, Jung ID, Nam SW et al. Enzymatic activation of autotaxin by divalent cations without EF-hand loop region involvement. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 219-224.

373. Jansen S, Callewaert N, Dewerte I et al. An essential oligomannosidic glycan chain in the catalytic domain of autotaxin, a secreted lysophospholipase-D. *J Biol Chem* 2007; 282: 11084-11091.
374. Koh E, Bandle RW, Roberts DD, Stracke ML, Clair T. Novel point mutations attenuate autotaxin activity. *Lipids Health Dis* 2009; Feb 17; 8:4.
375. Giganti A, Rodriguez M, Fould B et al. Murine and human autotaxin alpha, beta, and gamma isoforms: gene organization, tissue distribution, and biochemical characterization. *J Biol Chem* 2008; 283: 7776-89.
376. Murata J et al. cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J Biol Chem* 1994; 269(48): p. 30479-84.
377. Lee HY, Murata J, Clair T et al. Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218: 714-719.
378. Berdichevets IN et al. Lysophosphatidic acid is a lipid mediator with wide range of biological activities. Biosynthetic pathways and mechanism of action. *Biochemistry* 2010; 75(9): p. 1088-97.
379. Mori K et al., Submucosal connective tissue-type mast cells contribute to the production of lysophosphatidic acid (LPA) in the gastrointestinal tract through the secretion of autotaxin (ATX) lysophospholipase D (lysoPLD). *Virchows Arch* 2007; 451(1): p. 47-56.
380. Ferry G et al. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 2003; 278(20): p.18162-9.
381. Tokumura A et al. Peritoneal fluids from patients with certain gynecologic tumor contain elevated levels of bioactive lysophospholipase D activity. *Life Sci* 2007. 80(18): p.1641-9.
382. Sato K et al. Identification of autotaxin as a neurite retraction-inducing factor of PCI 2 cells in cerebrospinal fluid and its possible sources. *J Neurochem* 2005; 92(4): p.904-14.
383. Ohkawa R et al. Lysophospholipase D activity exists in the urine to catalyse the formation of lysophosphatidic acid. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(12): p.3612-3.
384. Chen, Mazereeuw-Hautier J et al. Production of lysophosphatidic acid in blister fluid: involvement of a lysophospholipase D activity. *J Invest Dermatol* 2005; 125(3): p.421-7.
385. Corcoran DL et al. Footer: a quantitative comparative genomics method for efficient recognition of cis-regulatory elements. *Genome Res* 2005; 15(6): p.840 7.
386. Williams TM, Williams ME, Kuick R et al. Candidate downstream regulated genes of HOX group 13 transcription factors with and without monomeric DNA binding capability. *Dev Biol* 2005; 279(2): p.462-80.

387. Black EJ, Clair T, Delrow J et al. Microarray analysis identifies Autotaxin, a tumour cell motility and angiogenic factor with lysophospholipase D activity, as a specific target of cell transformation by v-Jun. *Oncogene* 2004; 23: 2357-2366.
388. Kehlen A et al. Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 2004; 109(6): p. 833-8.
389. Chen M and O'Connor KL. Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells. *Oncogene* 2005; 24: 5125-5130.
390. Clair T et al. Autotaxin is an exoenzyme possessing 5'-nucleotide phosphodiesterase/ATP pyrophosphatase and ATPase activities. *J Biol Chem* 1997; 272(2): p. 996-1001.
391. Tokumura, A., et al., Metal-ion stimulation and inhibition of lysophospholipase D which generates bioactive lysophosphatidic acid in rat plasma. *Lipids* 1998; 33(10): p. 1009-15.
392. Croset, M et al. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem J* 2000; 345 Pt 1: p. 61-7.
393. van Meeteren, LA et al. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 2006.26(13): p.5015-22.
394. Tanaka, M., et al., Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 2006; 281(35): p. 25822-30.
395. Tsuda S, Okudaira S, Moriya-Ito K et al. Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood. *J Biol Chem* 2006; 281: 26081-26088.
396. Clair T, Aoki J, Koh E et al. Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res* 2003; 63: 5446-5453.
397. McDermott MI, Sigal YJ, Crump JS, Morris AJ. Enzymatic analysis of lipid phosphate phosphatases. *Methods* 2006; 39:169-179.
398. Smyth SS, Mueller P, Yang F et al. Arguing the case for the autotaxin-lysophosphatidic acid-lipid phosphate phosphatase 3-signaling nexus in the development and complications of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014 Mar;34(3):479-86.
399. Van Meeteren LA et al. Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 2005; 280(22): p. 21155-61.
400. Zehra Pamuklar, Lorenzo Federico, Shuying Liu et al. Autotaxin/Lysopholipase D and Lysophosphatidic Acid Regulate Murine Hemostasis and Thrombosis. *J Biol Chem* 2009 Mar 13;284(11):7385-94.
401. Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K et al. Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *J.Clin.Gastroenterol* 2007; 41,616-623.
402. Knowlden S and Georas SN. The autotaxin-LPA axis emerges as a novel regulator of lymphocyte homing and inflammation. *J. Immunol* 2014; 192, 851-857.

403. Orosa B, García S, Conde C. The autotaxin–lysophosphatidic acid pathway in pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Pharmacol* 2015, 765, 228-233.
404. Nikolaou A, Kokotou MG, Limmios D, Psarra A and Kokotos G. Autotaxin inhibitors: a patent review (2012-2016). *Expert Opin Ther Pat.* 2017 Jul;27(7):815-829.
405. Saga H, Ohhata A, Hayashi A et al. A novel highly potent autotaxin/ENPP2 inhibitor produces prolonged decreases in plasma lysophosphatidic acid formation in vivo and regulates urethral tension. *PLoS One* 2014 Apr 18;9(4): e93230.
406. Tigyi G. Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol* 2010; 161: 241- 270.
407. Jiang G et al. Alpha-substituted phosphonate analogues of lysophosphatidic acid (LPA) selectively inhibit production and action of LPA. *Med Chem* 2007; 2(5): p. 679-90.
408. Cui P et al. Synthesis and biological evaluation of phosphonate derivatives as autotaxin (ATX) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17(6): p. 1634-40.
409. Van Meeteren, LA et al. Anticancer activity of FTY720: phosphorylated FTY720 inhibits autotaxin, a metastasis-enhancing and angiogenic lysophospholipase D. *Cancer Lett* 2008; 266(2): p.203-8.
410. Gierse J, Thorarensen A, Beltey K et al. A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 334: 310–317.
411. Ferry G, Moulharat N, Pradère JP et al. S32826, a nanomolar inhibitor of autotaxin: discovery, synthesis and applications as a pharmacological tool. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327: 809–819.
412. Jiang G, Madan D and Prestwich GD. Aromatic phosphonates inhibit the lysophospholipase D activity of autotaxin. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(17): p. 5098-101.
413. Albers HM, Dong A, van Meeteren LA et al. Boronic acid-based inhibitor of autotaxin reveals rapid turnover of LPA in the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 7257–7262.
414. Albers HM et al. Discovery and optimization of boronic acid based inhibitors of autotaxin. *J Med Chem* 2011; 53(13): p. 4958-67.
415. Desroy N, Housseman C, Bock X et al. Discovery of GLPG1690, a First-in-Class Autotaxin Inhibitor Undergoing Clinical Evaluation for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Med Chem* 2017 May 11;60(9):3580-3590.
416. Castagna D, Budd DC, Macdonald SJ, Jamieson C, Watson AJ. Development of Autotaxin Inhibitors: An Overview of the Patent and Primary Literature. *J Med Chem* 2016 Jun 23;59(12):5604-21.

417. Roland Blanque, Nicolas Desroy, Sonia Dupont et al. Pharmacological profile and efficacy of GLPG1690, a novel ATX inhibitor for COPD treatment. *European Respiratory Journal* 2015; 46: PA2129; DOI: 10.1183/13993003.congress-2015.PA2129. Ref Type: Abstract.
418. Vogt W. Pharmacologically active acidic phospholipids and glycolipids. *Biochem Pharmacol* 1963; 12: 415-420.
419. Sei-Jung Lee<sup>1</sup> and C. Chris Yun. Colorectal cancer cells proliferation, survival and invasion by lysophosphatidic acid. *Int J Biochem Cell Biol* 2010 December; 42(12): 1907–1910.
420. Xie Y, Gibbs TC, Meier KE. Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1582: 270-281.
421. Aikawa S, Hashimoto T, Kano K, Aoki J. Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *J Biochem* 2015 Feb;157(2):81-9.
422. Tigyí G and Miledi R. Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 1992; 267(30): p.21360-7.
423. Eichholtz T et al. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 1993; 291 (Pt 3): p. 677-80.
424. Sugiura T et al. Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva. *J Lipid Res* 2002; 43(12): p.2049-55.
425. Mettu PS et al. Role of lysophospholipid growth factors in the modulation of aqueous humor outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(7): p. 2263-71.
426. Saulnier-Blache J. [Lysophosphatidic acid: a "bioactive" phospholipid]. *Med Sci* 2004 Aug-Sep;20(8-9):799-803.
427. Mills GB and Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003 3: 582-591.
428. Sasagawa T et al. Abnormal serum lysophospholipids in multiple myeloma patients. *Lipids* 1999; 34(1): p. 17-21.
429. Sasagawa T et al. The significance of plasma lysophospholipids in patients with renal failure on hemodialysis. *J Nutr Sci Vitaminol* 1998; 44(6): p. 809-18.
430. Sutphen R et al. Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(7): p. 1185-91.
431. Fourcade O et al. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 1995. 80(6): p. 919-27.

432. Sevastou I, Kaffe E, Mouratis MA, Aidinis V. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA2/LPC and ATX/LPA axes. *Biochim Biophys Acta* 2013 Jan;1831(1):42-60.
433. Goetzl EJ, Lee H, Azuma T et al. Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 2000; 275: 14573-14578.
434. Coleman RA and Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 2004 43(2): 134-176.
435. Hiramatsu T, Sonoda H, Takanezawa Y. Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1alpha and mPA-PLA1beta. *J Biol Chem* 2003 Dec 5;278(49):49438-47.
436. Aoki J et al. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem* 2002; 277(50): p. 48737-44.
437. Bektas M et al. A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells. *J Cell Biol* 2005; 169(5): p. 801-11.
438. Gaits F, Fourcade O, Le Balle F et al. Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett* 1997 Jun 23;410(1):54-8.
439. Sano T et al. Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem* 2002; 277(24): p. 21197-206.
440. Aoki J, Inoue A, Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781(9):513-8.
441. Tomsig JL, Snyder AH, Berdyshev EV et al. Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *Biochem J* 2009 May 1;419(3):611-8.
442. Brindley DN, English D, Pilquil C et al. Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochim Biophys Acta* 2002;1582(1-3):33-44.
443. Morisseau C, Schebb NH, Dong H. Role of soluble epoxide hydrolase phosphatase activity in the metabolism of lysophosphatidic acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 Mar 23;419(4):796-800.
444. Choi JW1, Herr DR, Noguchi K et al. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50:157-86.
445. Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N. Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371: 707-712.
446. Oka S, Ota R, Shima M, Yamashita A, Sugiura T. GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 395: 232-237.

447. Inés González-Gil, Debora Zian, Henar Vázquez-Villa et al. The status of the lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1R). *Med. Chem. Commun* 2015; 6, 13-23.
448. Meyer zu Heringdorf, D and Jakobs KH. Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 2007; 1768(4): p. 923-40.
449. Ishii L et al. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: p. 321-54.
450. Tager AM, LaCamera P, Shea BS et al. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* 2008; 14: 45-54.
451. Roberts C et al. Neurochemical changes in LPA1 receptor deficient mice a putative model of schizophrenia. *Neurochem Res* 2005; 30(3): p. 371-7.
452. Baldi A et al. Identification of genes down-regulated during melanoma progression: a cDNA array study. *Exp Dermatol* 2003; 12(2): p. 213-8.
453. Yun CY, Nicole CS, Hope Mirendil, and Jerold Chun. Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in the nervous system. *Neuron* 2015 Feb 18; 85(4): 669–682.
454. Contos JJ, Ishii I, Fukushima N et al. Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2). *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6921-6929.
455. Choi JW, Lee CW, Chun J. Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim Biophys Acta* 2008 Sep;1781(9):531-9.
456. Contos JJ and Chun J. The mouse lp(A3)/Edg7 lysophosphatidic acid receptor gene: genomic structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Gene* 2001; 267(2): p. 243-53.
457. Ishii S, Noguchi K, Yanagida K. Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2009;89(3-4):57-65.
458. Noguchi K, Ishii S, Shimizu T. Identification of p2y9/GPR23 as a Novel G Protein coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid, Structurally Distant from the Edg Family. *Journal of Biological Chemistry* 2003 July 11, 2003;278(28):25600-6.
459. Lee CW et al. GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA 5. *J Biol Chem* 2006; 281(33): p. 23589-97.
460. Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2009 Feb;9(1):15-23.
461. McIntyre TM et al. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(1): p. 131-6.

462. Zhang C et al. Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPARgamma activation. *J Exp Med* 2004; 199(6): p. 763-74.
463. Heasley BH et al. Initial structure-activity relationships of lysophosphatidic acid receptor antagonists: discovery of a high-affinity LPA1/LPA3 receptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14(11): p. 2735-40.
464. Boucharaba A et al. The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(25): p. 9643-8.
465. Kritikou E, van Puijvelde GH, van der Heijden T et al. Inhibition of lysophosphatidic acid receptors 1 and 3 attenuates atherosclerosis development in LDL-receptor deficient mice. *Sci Rep* 2016 Nov 24; 6:37585.
466. Heise CE et al. Activity of 2-substituted lysophosphatidic acid (LPA) analogs at LPA receptors: discovery of a LPA1/LPA3 receptor antagonist. *Mol Pharmacol* 2001; 60(6): p. 1173-80.
467. Xue J, Gan L, Li X et al. Effects of lysophosphatidic acid and its receptors LPA<sub>1/3</sub> on radiation pneumonitis. *Oncol Rep* 2010 Dec;24(6):1515-20.
468. JS Swaney, C Chapman, LD Correa et al. A novel, orally active LPA1 receptor antagonist inhibits lung fibrosis in the mouse bleomycin model. *Br J Pharmacol* 2010 Aug; 160(7): 1699–1713.
469. Hama K et al. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem* 2004; 279(17): p. 17634-9.
470. Saba JD. Lysophospholipids in development: Miles apart and edging in. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004;92(5):967-92.
471. Song J, Clair T, Noh JH et al. Autotaxin (lysoPLD/NPP2) protects fibroblasts from apoptosis through its enzymatic product, lysophosphatidic acid, utilizing albumin-bound substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 967-975.
472. Rusovici R, Ghaleb A, Shim H, Yang VW, Yun CC. Lysophosphatidic acid prevents apoptosis of Caco-2 colon cancer cells via activation of mitogen-activated protein kinase and phosphorylation of Bad. *Biochim Biophys Acta* 2007 Aug;1770(8):1194-203.
473. Fishman DA, Liu Y, Ellerbroek SM, Stack MS. Lysophosphatidic acid promotes matrix metalloproteinase (MMP) activation and MMP-dependent invasion in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 3194-3199.
474. Subramanian P et al. Lysophosphatidic acid receptors LPA1 and LPA3 promote CXCL12-mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation. *Circ Res* 2010; 107(1): p. 96-105.
475. Zhou Z, Subramanian P, Sevilmis G et al. Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab* 2011 May 4;13(5):592-600.

476. Valet P, Pagès C, Jeanneton O et al. Alpha2- adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *The Journal of Clinical Investigation* 1998;101(7):1431-8.
477. Karliner JS. Lysophospholipids and the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta* 2002;1582(1-3):216-21.
478. Castilla-Ortega E, Sánchez-López J, Hoyo-Becerra C et al. Exploratory, anxiety and spatial memory impairments are dissociated in mice lacking the LPA1 receptor. *Neurobiol Learn Mem* 2010 Jul;94(1):73-82.
479. Balazs L et al. Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280(2): p. R466-72.
480. Sturm A and Dignass AU. Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1582(1-3): p. 282-8.
481. Rancoule, C et al. Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis. *pExpert Opin Investig Drugs* 2011; 20(5): p. 657-67.
482. Pradère JP1, Gonzalez J, Klein J et al. Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2008 Sep;1781(9):582-7.
483. Andrew M. Tager. Autotaxin emerges as a therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis: limiting fibrosis by limiting lysophosphatidic acid synthesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012 Nov;47(5):563-5.
484. Chloé Rancoule, Sophie Espenel, Jane-Chloé Trone et al. Lysophosphatidic acid (LPA) as a pro-fibrotic and pro-oncogenic factor: a pivotal target to improve the radiotherapy therapeutic index. *Oncotarget* 2017 Jun 27; 8(26): 43543–43554.
485. Dong-Soon Im. Translational research on autotaxin-LPA-LPA receptors and drug discovery. *Clinical Lipidology* 2015; 10:2, 177-190.
486. Dong-Soon Im. First-in-class antifibrotic therapy targeting type 1 lysophosphatidic acid receptor. *Archives of Pharmacal Research June 2012; Volume 35, Issue 6, pp 945–948.*
487. Zhang Y, Chen YC, Krummel MF, Rosen SD. Autotaxin through lysophosphatidic acid stimulates polarization, motility, and transendothelial migration of naive T cells. *J Immunol* 2012; 189:3914–3924.
488. Yin Z, Carbone LD, Gotoh A et al. Lysophosphatidic acid-activated Cl<sup>-</sup> current activity in human systemic sclerosis skin fibroblasts. *Rheumatology* 2010; 49: 2290–2297.
489. Zhao C, Fernandes MJ, Prestwich GD et al. Regulation of lysophosphatidic acid receptor expression and function in human synoviocytes: implications for rheumatoid arthritis. *Mol. Pharmacol* 2008; 73: 587–600.

490. Zhao C et al. TNF- $\alpha$  promotes LPA1- and LPA3-mediated recruitment of leukocytes in vivo through CXCR2 ligand chemokines. *J Lipid Res* 2011; 52(7): p.1307-18.
491. Ting Liu, Lingyun Zhang, Donghyun Joo and Shao-Cong Sun. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2017; 2, e17023.
492. Vijay Singh, Damodar Gupta, and Rajesh Arora. NF- $\kappa$ B as a key player in regulation of cellular radiation responses and identification of radiation countermeasures. *Discoveries* 2015; Jan-Mar 3(1): e35.
493. Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ. NF- $\kappa$ B control of T cell development. *Nat Immunol* 2014 Jan;15(1):15-25.
494. Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR et al. NF- $\kappa$ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene* 2011 Apr 7;30(14):1615-30.
495. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NFkappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18(49): 6853-6866.
496. Hayden MS and Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008 Feb 8;132(3):344-62.
497. Oeckinghaus A and Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009 Oct;1(4): a000034.
498. Ghosh G, Wang VY, Huang DB and Fusco A. NF-kappaB regulation: lessons from structures. *Immunological reviews* 2012; 246, 36-58.
499. Ghosh CC, Ramaswami S, Juvekar A et al. Gene-specific repression of proinflammatory cytokines in stimulated human macrophages by nuclear I $\kappa$ B $\alpha$ . *Journal of Immunology* 2010; vol. 185, no. 6, pp. 3685–3693,
500. Xiao G, Rabson AB, Young W et al. Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease. *Cytokine & growth factor reviews* 2006;17, 281-293.
501. Sasaki CY, Barberi TJ, Ghosh P and Longo DL. Phosphorylation of Re1A/p65 on serine 536 defines an I $\kappa$ B $\alpha$ - independent NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2005; vol. 280, no. 41, pp. 34538–34547.
502. Pradère JP, Hernandez C, Koppe C et al. Negative regulation of NF- $\kappa$ B p65 activity by serine 536 phosphorylation. *Sci Signal* 2016 Aug 23;9(442): ra85.
503. Frank Christian, Emma L. Smith, and Ruaidhrí J. Carmody. The Regulation of NF- $\kappa$ B Subunits by Phosphorylation. *Cells* 2016 Mar; 5(1): 12.
504. Pasternack SM, von Kügelgen I, Al Aboud K, et al. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet.* 2008 Mar;40(3):329-34. doi: 10.1038/ng.84. Epub 2008 Feb 24.

505. Moles A, Sanchez AM, Banks PS et al. Inhibition of RelA-Ser536 phosphorylation by a competing peptide reduces mouse liver fibrosis without blocking the innate immune response. *Hepatology* 2013; 57:817–828.
506. Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P et al . Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogenand stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J* 2003, 22, 1313-1324.
507. Zhong H, Voll RE, and Ghosh S. Phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Molecular Cell* 1998; vol. 1, no. 5, pp. 661–671.
508. Nowak DE, Tian B, Jamaluddin M et al. RelA Ser276 Phosphorylation Is Required for Activation of a Subset of Nf-Kappab-Dependent Genes by Recruiting Cyclin-Dependent Kinase 9/Cyclin T1 Complexes. *Mol. Cell Biol* 2008, 28, 3623–3638.
509. Sun W and Yang J. Molecular basis of lysophosphatidic acid-induced NF- $\kappa$ B activation. *Cell Signal* 2010 Dec;22(12):1799-803.
510. Sun J and Lin X. Beta-arrestin 2 is required for lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 November 4;105(44):17085-90.
511. Klemm S, Zimmermann S, Peschel C et al . Bcl10 and Malt1 control lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Jan 2;104(1):134-8.
512. Sun W, Li H, Yu Y et al . M MEKK3 is required for lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation. *Cell Signal* 2009 Oct;21(10):1488-94.
513. Shimada H, Rajagopalan LE. Rho kinase-2 activation in human endothelial cells drives lysophosphatidic acid-mediated expression of cell adhesion molecules via NF-kappaB p65. *J Biol Chem* 2010 Apr 23;285(17):12536-42.
514. Kime C, Sakaki-Yumoto M, Goodrich L et al. Autotaxin-mediated lipid signaling intersects with LIF and BMP signaling to promote the naive pluripotency transcription factor program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 Nov 1;113(44):12478-12483.
515. Yao L, Romero MJ, and Toque HA. The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Dis Res* 2010 Oct;1(4):165-70.
516. Jamaluddin M, Wang S, Boldogh I, Tian B, and Brasier AR. TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B/RelA Ser276 phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cellular Signalling* 2007; vol. 19, no. 7, pp. 1419–1433,
517. Zhao MM, Xu MJ, Cai Y et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vitro and in vivo. *Kidney Int* 2011 May;79(10):1071-9.
518. Akahori H, Tsujino T, Naito Y et al. Nuclear factor- $\kappa$ B-hypoxia-inducible factor-2 pathway in aortic valve stenosis. *J Heart Valve Dis* 2014 Sep;23(5):558-66.

519. Zeng Q, Jin C, Ao L et al . Cross-talk between the Toll-like receptor 4 and Notch1 pathways augments the inflammatory response in the interstitial cells of stenotic human aortic valves. *Circulation* 2012 Sep 11;126(11 Suppl 1): S222-30.
520. Wang D, Zeng Q, Song R et al. Ligation of ICAM-1 on human aortic valve interstitial cells induces the osteogenic response: A critical role of the Notch1-NF- $\kappa$ B pathway in BMP-2 expression. *Biochim Biophys Acta* 2014 Nov;1843(11):2744-53.
521. Boucher, J., et al., Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia*, 2005. 48(3): p. 569-77.
522. Choudhary S, Lu M, Cui R, and Brasier AR. Involvement of a novel Rac/RhoA guanosine triphosphatase-nuclear factor-kappaB inducing kinase signaling pathway mediating angiotensin II-induced RelA transactivation. *Mol Endocrinol* 2007 Sep;21(9):2203-17.
523. McAllister-Lucas LM, Ruland J, Siu K et al. CARMA3/Bcl10/MALT1-dependent NF- $\kappa$ B activation mediates angiotensin II-responsive inflammatory signaling in nonimmune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Jan 2;104(1):139-44.
524. Hochrainer K, Racchumi G, Anrather J. Site-specific phosphorylation of the p65 protein subunit mediates selective gene expression by differential NF-kappaB and RNA polymerase II promoter recruitment. *J Biol Chem* 2013;288(1):285-93.
525. Rancoule C, Dusaulcy R, Treguer K et al. Involvement of autotaxin/lysophosphatidic acid signaling in obesity and impaired glucose homeostasis. *Biochimie* 2014; 96: 140–3.
526. Mathieu P, Arsenault BJ. CAVD: civilization aortic valve disease. *Eur Heart J* 2017; 38:2198-2200.
527. Jang WG, Kim EJ, Kim DK et al . BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription. *J Biol Chem* 2012 Jan 6;287(2):905-15.
528. Lehti S, Kakela R, Horkko S et al. Modified lipoprotein-derived lipid particles accumulate in human stenotic aortic valves. *PLoS One* 2013;8(6):e65810.
529. Saida Mebarek et al. Phospholipases of Mineralization Competent Cells and Matrix Vesicles: Roles in Physiological and Pathological Mineralizations. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14(3), 5036-5129; doi:10.3390/ijms14035036.
530. Bin Yu, Anouar Hafiane, George Thanassoulis et al . Lipoprotein(a) Induces Human Aortic Valve Interstitial Cell Calcification. *JAmColl Cardiol Basic Trans Science* 2017;2(4):358–71.
531. Siess W, Zangl KJ, Essler M et al. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:6931–6936.

532. Salles JP, Laurencin-Dalricieux S, Conte-Auriol F et al. Bone defects in LPA receptor genetically modified mice. *Biochim Biophys Acta* 2013 Jan;1831(1):93-8.
533. Leon MB, Smith CR, Mack MJ et al. Transcatheter or surgical aortic-valve replacement in intermediate-risk patients. *N Engl J Med* 2016; 374:1609–1620.
534. Mathieu P, Boulanger MC, and Bouchareb R. Molecular biology of calcific aortic valve disease: towards new pharmacological therapies. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2014; 12:851–862.
535. Teo KK, Corsi DJ, Tam JW et al. Lipid lowering on progression of mild to moderate aortic stenosis: meta-analysis of the randomized placebo-controlled clinical trials on 2344 patients. *Can J Cardiol* 2011;27: 800–8.
536. Khera AV, Everett BM, Caulfield MP et al. Lipoprotein(a) concentrations, rosuvastatin therapy, and residual vascular risk: an analysis from the JUPITER Trial (Justification for the Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin. *Circulation* 2014; 129:635–642.
537. Monzack EL and Masters KS. A time course investigation of the statin paradox among valvular interstitial cell phenotypes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 303:H903–H909.
538. Thanassoulis G. Lipoprotein (a) in calcific aortic valve disease: from genomics to novel drug target for aortic stenosis. *J Lipid Res* 2016 Jun;57(6):917-24.
539. Raal FJ, Giugliano RP, Sabatine MS et al. PCSK9 inhibition-mediated reduction in Lp(a) with evolocumab: an analysis of 10 clinical trials and the LDL receptor's role. *J Lipid Res* 2016 June;57(6):1086-96.
540. Dusaulcy R, Rancoule C, Gres S, Wanecq E, Colom A, Guigne C et al. Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res* 2011; 52(6): 1247-55.
541. Merki E, Graham M, Taleb A et al. Antisense oligonucleotide lowers plasma levels of apolipoprotein (a) and lipoprotein (a) in transgenic mice. *J. Am. Coll. Cardiol* 2011; 57: 1611–1621.
542. Tsimikas S. A Test in Context: Lipoprotein(a): Diagnosis, Prognosis, Controversies, and Emerging Therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Feb 14;69(6):692-711.
543. Moreno R, Sobotzik JM, Schultz C, Schmitz ML. Specification of the NF-kappaB transcriptional response by p65 phosphorylation and TNF-induced nuclear translocation of IKK epsilon. *Nucleic Acids Res* 2010;38(18):6029-44.
544. Ishinaga H. et al. TGF-beta induces p65 acetylation to enhance bacteria-induced NF-kappaB activation. *EMBO J* 26, 1150–1162 (2007).

545. Peng Y, Kim JM, Park HS, Yang A, Islam C, Lakatta EG, Lin L. AGE-RAGE signal generates a specific NF-kappaB RelA "barcode" that directs collagen I expression. *Sci Rep* 2016; 6:18822.
546. Jiang, X., Takahashi, N., Matsui, N., Tetsuka, T. and Okamoto, T. (2003) The NF-kappa B activation in lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine J Biol Chem, 278, 919-926.
547. Mattioli, I., Sebald, A., Bucher, C., Charles, R.P., Nakano, H., Doi, T., Kracht, M. and Schmitz, M.L. (2004b) Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import. *J Immunol*, 172, 6336-6344.
548. Buss H., Dörrie A., Schmitz M. L., Hoffmann E., Resch K. and Kracht M. 2004. Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- $\kappa$ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I $\kappa$ B kinase (IKK)- $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 55633-55643.
549. Mattioli, I., Geng, H., Sebald, A., Hodel, M., Bucher, C., Kracht, M. and Schmitz, M.L. (2006) Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon. *J Biol Chem*, 281, 6175-6183.
550. Adli, M. and Baldwin, A.S. (2006) IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *J Biol Chem*, 281, 26976-26984.
551. Bohuslav, J., Chen, L.F., Kwon, H., Mu, Y. and Greene, W.C. (2004) p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J Biol Chem*, 279, 26115-26125.
552. Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G.Y., Nizet, V. and Karin, M. (2005) IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature*, 434, 1138-1143.
553. Fujita, F., Taniguchi, Y., Kato, T., Narita, Y., Furuya, A., Ogawa, T., Sakurai, H., Joh, T., Itoh, M., Delhase, M., Karin, M. and Nakanishi, M. (2003) Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol Cell Biol*, 23, 7780-7793.
554. O'Mahony, A.M., Montano, M., Van Beneden, K., Chen, L.F. and Greene, W.C. (2004) Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax induction of biologically Active NF-kappaB requires IkappaB kinase-1-mediated phosphorylation of RelA/p65. *J Biol Chem*, 279, 18137-18145.

555. Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T. and Toriumi, W. (1999) IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem*, 274, 30353-30356.
556. Bascands JL1 and Schanstra JP. Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals. *Kidney Int*. 2005 Sep;68(3):925-37.
557. Pradère JP1, Klein J, Grès S et al. LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Dec;18(12):3110-8. Epub 2007 Nov 14.
558. Quinlan AM, Billiar KL. Investigating the role of substrate stiffness in the persistence of valvular interstitial cell activation. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100:2474-2482.
559. Pierre Marie. Differentiation, function and regulation of osteoblast. *Med Sci (Paris)* 2001; 17 : 1252–1259.