

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES FONDAMENTALES - SANTÉ N°619

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Biochimie-Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Amandine WAHART

Le 3 juillet 2019

**Implication de l'axe RAGE / Cathepsine S / Peptides d'élastine dans la
survenue des calcifications vasculaires associées
à l'insuffisance rénale chronique**

Thèse dirigée par

Pr. Laurent DUCA ET Pr. Fatouma TOURE

JURY

M. Gilles Faury,	Professeur,	Université de Grenoble, France	Rapporteur
M. Éric Boulanger,	Professeur,	Université de Lille, France	Rapporteur
Mme Sylvie Ricard Blum,	Professeur,	Université de Lyon, France	Examinatrice
M. Fabien Lecaille,	Maître de Conférences HDR,	Université de Tours, France	Examinateur
M. Laurent Martiny	Professeur,	Université de Reims, France	Président du jury
Mme Muriel Laffargue,	Directeur de Recherche,	INSERM, Toulouse, France	Invitée
M Laurent Duca,	Professeur,	Université de Reims, France	Directeur de thèse
Mme Fatouma Toure,	Professeur,	Université de Limoge, France	Directrice de thèse

Implication de l'axe RAGE / Cathepsine S / Peptides d'élastine dans la survenue des calcifications vasculaires au cours de l'insuffisance rénale chronique.

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est un problème de santé touchant 10 à 15% de la population mondiale. Les principales causes de décès associées sont les complications cardiovasculaires, principalement les calcifications, et il est nécessaire de proposer de manière urgente de nouvelles thérapies. Nous avons montré un rôle pour le récepteur aux produits de glycation avancés (RAGE) dans le processus de calcification. Plusieurs études ont de plus suggéré l'implication de la Cathepsine S (CathS) dans l'élastolyse et les calcifications vasculaires associées à la néphropathie. Cependant, le lien entre ces différents acteurs et leur implication dans les calcifications vasculaires restait inconnu. Nous avons utilisé des modèles de souris IRC ApoE^{-/-} ou ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} (DKO). L'induction de l'IRC augmente les calcifications, l'expression de CathS et l'élastolyse de manière dépendante de RAGE. Nous avons montré par microscopie électronique à balayage et spectrométrie de masse que la CathS dégrade l'élastine insoluble et produit des peptides d'élastine (PE) bioactifs. Ces derniers participent aux processus de calcification *in vitro* des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) potentialisant l'effet du phosphate inorganique. Le complexe récepteur de l'élastine (CRE) est impliqué et les effets pro-calcifiants des PE étudiés ont été confirmés *ex vivo* et *in vivo*. Ces peptides participent à une boucle d'amplification en déclenchant l'expression de CathS et le ciblage *in vivo* du CRE avec du Tamiflu® conduit à une amélioration des complications associées à la calcification, la rigidité vasculaire et l'arythmie cardiaque.

Mots-clés en français : RAGE, Cathepsine S, calcifications vasculaires, peptides d'élastine, insuffisance rénale chronique

Involvement of a RAGE / Cathepsin S / Elastin peptides axis in vascular calcifications during chronic kidney disease

Chronic Kidney Disease (CKD) is a major health problem affecting 10% to 15% of worldwide population. The main-associated causes of death are cardiovascular complications, mainly represented by vascular calcifications for which it is necessary to urgently propose new therapeutics. We recently reported a role for the Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE) in the uremic vascular calcification process following engagement by uremic toxins. Interestingly, several studies suggested the involvement of Cathepsin S (CathS) in CKD-associated elastolysis and vascular calcifications. However, the link between these different actors and their involvement in vascular calcifications remained unknown. We used a mice model of CKD in ApoE^{-/-} or ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} (DKO) backgrounds. We found that induction of CKD increased the calcification process, CathS expression and elastolysis in a RAGE-dependent manner. We showed by electron microscopy scanning and mass spectrometry that CathS degrades insoluble elastin producing bioactive elastin-derived peptides (EDPs). The latter trigger *in vitro* calcification process of vascular smooth muscle cells (VSMCs) by potentiating inorganic phosphate effect. The elastin receptor complex (ERC) is involved and results about pro-calcifying effects of CathS-derived EDPs were confirmed *ex vivo* and *in vivo*. CathS-derived EDPs participated in an amplification loop by triggering CathS expression and the *in vivo* targeting of ERC with Tamiflu® leads to an improvement of calcification-associated complications, *i.e.* vascular stiffness and cardiac arrhythmias.

Mots-clés en anglais : RAGE, Cathepsin S, elastin derived peptides, vascular calcifications, chronic kidney disease

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Biochimie-Biologie cellulaire

Remerciements

Ma thèse de doctorat a été effectuée au sein de l'UMR URCA / CNRS 7369 " Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire " (MEDyC), et je tiens dans un premier temps à remercier son directeur, le Professeur Laurent MARTINY pour m'avoir accueillie et permis de réaliser mon travail.

Je présente tous mes remerciements aux Professeurs Éric BOULANGER et Gilles FAURY pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie également le Professeurs Sylvie RICARD-BLUM et le Docteur Fabien LECAILLE d'avoir accepté de siéger à mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je tiens également à adresser mes plus sincères remerciements au Dr Muriel LAFFARGUE pour avoir accepté cette invitation.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et un grand respect aux Professeurs Laurent DUCA et Fatouma TOURE pour avoir dirigé ce travail de thèse.

Un travail de thèse ne peut être mené à bien sans le soutien financier de nombreux organismes. Ainsi, je tiens à adresser à mes sincères remerciements au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, au Centre National de la Recherche Scientifique, au Fonds Européen de Développement Régional ainsi qu'à l'Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA).

Enfin je tiens particulièrement à remercier la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA) qui m'a permis de finir ce projet de thèse dans les meilleures conditions grâce à l'attribution d'une bourse de fin de thèse.

Je ne pouvais pas écrire ces remerciements personnels sans commencer par toi, Dude. Un professeur pendant des années, puis un collègue de travail pour finalement devenir mon directeur de thèse. Je ne te remercierai jamais assez pour ta confiance en m'encourageant à postuler à cette thèse, qui m'a permis de devenir aujourd'hui, docteur en biologie biochimie. Je te suis reconnaissante de m'avoir guidée et de m'avoir conseillée pendant ces trois années, tout en me laissant diriger ce projet comme je le souhaitais. Cela n'a pas toujours été facile mais cela a toujours payé jusqu'à ce 3 juillet 2019. J'ai beaucoup appris à tes côtés, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain, et notamment à être patiente =). J'ai appris que l'on pouvait bosser tout en riant... et je pense surtout à tes nombreuses imitations sur mon accent Ardennais qui faisaient beaucoup rire le chat et la beauté. C'est en partie grâce à toi que je peux dire aujourd'hui que la thèse une expérience enrichissante. Mais mon aventure élastine ne s'arrête pas là puisqu'elle se poursuit à Toulouse ...donc malheureusement pour toi, tu ne t'es pas encore débarrassé de moi =)

Je remercie également le Dr Jérôme Devy qui m'a fait découvrir, par le biais de mes différents stages de master, ce métier passionnant qu'est la recherche. Je vous remercie de votre confiance dès le début de notre travail. Je vous remercie de m'avoir offert la possibilité de me perfectionner dans l'imagerie pré-clinique grâce à ce poste d'ingénieur d'étude. Ceci a, en partie, contribué à l'obtention de ma bourse de thèse, sans un petit pincement au cœur de quitter la thématique du cancer.

Je remercie aussi l'équipe 3 MIME et plus particulièrement le Pr Manuel Dauchez et le Dr Nicolas Belloy pour leur investissement dans ce projet en abordant la partie in silico de ma thèse. Votre patience et vos conseils m'ont permis de mieux comprendre le comportement de mes peptides d'élastine et d'aborder avec plus de facilités cette drôle de matière obscure qui est la modélisation moléculaire =) mais cela n'aurait pas été possible sans votre bonne humeur à chacune de nos réunions.

Je tiens également à remercier remercier le Dr Christine Terryn pour m'avoir donné l'accès à la plateforme PICT. Tu fais partie de ces personnes qui savent écouter et comprendre ce que l'on veut. Cela a été un véritable plaisir de travailler avec toi.

Une grande partie de ma thèse a été un travail in vivo . Je tiens à remercier nos animaliers de la faculté de médecine, Perinne et Anthony. Je remercie chaleureusement notre animalier de la faculté des sciences, notre LuLu, un animalier mais surtout un artiste avec beaucoup de talent. Tu as toujours su être là quand j'en ai eu besoin, que ce soit pour mes nombreux déménagements de souris ou quand j'avais besoin d'un soutien moral dans les moments difficiles. Un grand

merci pour ton travail extraordinaire et pas toujours simple (des souris peuvent se perdre...) mais surtout pour ton amitié sans faille.

Je tiens à remercier le Dr Sébastien Blaise et le Dr Stéphanie Baud pour nos discussions scientifiques ou non... Merci de vos conseils et pour votre soutien tout au long de ces trois années et pour le chemin à suivre après la thèse. Je tiens également à remercier votre petite Marion qui, à chaque visite dans le laboratoire, m'a fait beaucoup rire et beaucoup courir =).

Merci au Dr Pascal Maurice pour nos nombreux échanges scientifiques, tes conseils et ton aide que ce soit pour la partie in vitro qu'avec mes souris. Je garderai un excellent souvenir de mes expériences de "mouse doppler" au cours desquelles nous échangeons sur divers sujets scientifiques ou plus personnels. Mais notre collaboration ne s'arrête pas là car je fais désormais partie de ton projet ANR et je te remercie de me faire autant confiance.

Je souhaite également remercier au Dr Hervé Sartelet. Tu as été un soutien de tous les instants surtout lors des moments d'attentes sans fin dans ton bureau =) mais aussi au cours des moments un peu difficiles jusqu'à m'accompagner lors de mes répétitions de présentation de thèse. Merci pour tes conseils et tes encouragements au cours de ces trois années mais aussi pour les nombreux fous rires que l'on a eu dans ton bureau ou en tp =).

Merci Lise, Cathy et Marie-Line pour vos conseils, votre aide de tout instants pendant toutes ces années que j'ai passée auprès de vous ainsi que pour votre investissement dans la collectivité du labo (organisation de raclette et autres repas conviviaux...à chaque fois une réussite). Je tiens encore à m'excuser pour tous mes nombreux oublis...nettoyage de l'évier tout rouge...mon matériel de western blot qui m'ont valu quelques remontrances bien méritées =)

Je voudrais également ne pas remercier le BI18 dont j'attends toujours l'adoption dans votre bureau malgré les nombreuses périodes d'essais =) =) :

Marie-Line ou mamie lab, toujours là pour nous écouter lorsqu'on a en besoin mais qui sait aussi nous mettre des cartons jaunes ou rouges comme une vraie mamie =) Merci pour tes conseils techniques mais également pour nos nombreux fous rires.

Oliver ou le chanteur du lab avec lequel les salles de labo deviennent des vrais karaokés pour le plus grand plaisir des autres utilisateurs =) Merci pour tes conseils techniques, pour les nombreux goûters mais pour aussi avoir reconnu une de mes plus grandes qualités : savoir me dénoncer lorsque j'ai fait une bêtise...je me suis beaucoup dénoncée...

Titof ou "mon mari" de lab...faudra un jour que je retrouve cette bague =) =) Je crois que tu es la seule personne qui me fait peur lorsqu'il a une règle à la main... promis je n'achèterai pas de

nouvelle tondeuse =). Je voudrai te remercier sincèrement pour tous tes conseils scientifiques en biologie moléculaire, mais surtout pour avoir été présent dans les moments de doute et pour tous nos fous rires et nos nombreux post-its. Je m'arrêterai là pour les choses sympas...t'as pas trop l'habitude =) et tu peux garder MON stylo rose que TU m'as volé =).

Merci aux doctorants qui m'ont accompagné pendant cette thèse (Océane, Camille, TomTom, Cuong, Aubéri, Aicha). Je vous souhaite plein de courage pour les années qu'il vous reste mais finalement c'est une super expérience et ce n'est que le début. Mention spéciale pour TomTom avec nos discussions plus ou moins scientifiques et nos fous rires en salle de manip (des histoires de mocassins, de bidons d'eau et de pantalon...). Mention encore plus spéciale pour Aubéri de m'avoir aidé sur la fin de ma thèse, pour nos manip à quatre mains. Tu es une super personne et une excellente scientifique donc crois toujours en toi et en ce que tu fais. Le chemin de la thèse n'est pas simple mais tu en es capable !!

Un grand merci à toi Ortilion, mon grand frère de thèse. Merci d'avoir toujours été agréable...de n'avoir jamais crié... et de ne m'avoir jamais stressé pour aller toujours plus vite lors des chirurgies. Merci d'avoir été là pour me montrer comment devenir un bon chercheur en discutant de nos résultats, de différents articles. Je ne te remercierai jamais assez pour m'avoir aidé dans les moments difficiles (chirurgies... sacrifices de 60 souris... calcifications). Ta passion pour la recherche est si grande que c'est ce qui fait de toi un très bon chercheur. Tu es un vrai grand frère...un exemple pour moi. Je te souhaite de pouvoir continuer car ce métier c'est toi.

Un énorme merci à mes amies Scando et Marie qui ont toujours été là. Nous nous sommes rencontrées au laboratoire et depuis on ne s'est plus jamais quitté. Merci pour nos soirées plus ou moins alcoolisées...pour tout votre soutien à chaque moment difficile...merci d'être vous. Cette thèse n'aurait pas été la même sans vous et ce petit bébé groot arrivé en cours de route =). Merci d'avoir cru en moi comme vous l'avez fait.

Une thèse sans collègues_ amies (je sais que ça vous fait plaisir!!) c'est impossible...Un énorme grand merci à toi mon chat et ma beauté!!!

Mon chat, toujours là pour les conneries à longueurs de journées...les soirées toujours alcoolisées...les fous rires... les massages... On a presque commencé et fini ensemble cette thèse et elle n'aurait pas été aussi enrichissante sans toi. Merci mon chat d'avoir toujours été là sans relâche dans tous les moments de doutes, de m'avoir écouté quand j'en avais besoin, de m'avoir remis en place quand c'était nécessaire. Tu es une excellente scientifique mon chat qui a su montrer que l'homéopathie ce n'était pas que de l'eau =). Tu vas partir au Canada pour vivre

une expérience extraordinaire... je crois en toi mon chat, tu vas tout déchirer là-bas et revenir encore plus forte. Je suis tellement fière de toi...fière d'avoir été ta marraine de thèse et fière d'être ton chat!! Tu fais partie de ce trinôme infernal que l'on forme avec ma beauté, et qui a rendu sourd certains Sirmiensiens!!

Ma beauté, toujours là pour les bons conseils remplis de sagesse...les soirées tout aussi alcoolisées...les fous rires...les moments de méditation...Je te dis un grand merci pour avoir toujours su être dans les bons comme dans les mauvais moments...d'avoir su trouver les mots dans les moments de doute avec ta sagesse de maman. Tu as partagé mon bureau pendant un an...la dernière ligne droite de ma thèse et heureusement que tu as été là pour que je puisse la finir dans de bonnes conditions!! On sait toute les deux la voie que tu dois suivre, car tu es excellente dans le domaine de la science. Crois en toi comme moi je crois en toi et tu déchireras tout !! Merci d'être ma beauté...merci d'être toi!!

Enfin un énorme merci pour avoir été des marraines de thèse au top niveau.

Je ne pouvais pas finir ces remerciements sans vous mentionner, ma famille. Un grand merci à mes tantes et à ma grand-mère (mamie cookies). Un énorme merci plus particulièrement à mes parents de m'avoir toujours soutenu dans tous mes choix, vous avez toujours eu confiance en moi. Vous avez toujours là pour m'aider aussi bien financièrement, physiquement et moralement. Il est évident que sans votre soutien sans faille, je n'aurai pas réussi à aller jusqu'au bout de ces huit années d'étude. Vous avez aussi supporté mes longues périodes de révisions intenses et mes moments de doutes ce qui implique indéniablement de gérer mon sale caractère dans ces moment-là. Merci de votre patience. Je voudrai aussi adresser quelques mots à ma sœur Juju, pour avoir toujours été un vrai soutien pour moi. Tu faisais partie de mes confidentes quand ça n'allait pas et tu trouvais toujours les mots justes pour me remonter le moral...Merci !! Enfin je te remercie aussi de ta compréhension face à mes absences lors des travaux de ta maison et de m'avoir permis d'écrire chez toi...ta maison a été un de mes endroits de prédilection pour écrire =)

Enfin, je dois le plus de grand merci à Gégé, mon mari. Merci d'avoir géré absolument tout au cours de ces derniers mois en t'occupant de l'appart, de trouver une maison à Toulouse et du déménagement tout en bossant de ton côté. Il paraît que je te dois 6 mois de tâches ménagères selon ton fan club formé par toutes mes amies...mais je te dois bien plus...sans toi je n'aurai sûrement pas vécu aussi bien ma thèse. Je te remercie d'avoir été là et d'avoir su gérer mes moments de doute et mes crises en me proposant souvent un Mcdo ou un bon repas => ...d'avoir supporté mon sale caractère à chaque moment de stress en essayant de crier plus fort

que moi...mais on ne dira pas qui avait toujours raison ⇒). Merci n'est pas encore suffisant pour tout ça... le mot n'existe pas tellement tu as fait pour moi en m'aidant à traverser cette épreuve ⇒). Tu as même continué à me soutenir en quittant tout (amis... famille... boulot) pour me suivre à Toulouse et pouvoir vivre de nouvelles aventures dans la ville rose.

Table des matières

Liste des abréviations.....	14
Liste des figures	19
Liste des tableaux.....	22
I. Introduction.....	24
A. L'insuffisance Rénale Chronique	24
1. Généralités	24
2. Épidémiologie.....	25
3. Diagnostic et évolution de la pathologie.....	26
3.1. Outils de diagnostic et détermination du stade de la maladie	26
3.2. Impact des antécédents du patient.....	28
3.3. Évaluation de la progression de la maladie rénale chronique	29
4. Les différents traitements.....	30
5. Les complications cardiovasculaires associées à l'Insuffisance Rénale Chronique.....	31
B. Modification de la paroi vasculaire au cours de l'IRC	32
1. La paroi vasculaire normale.....	32
1.1. Composition cellulaire.....	33
1.1.1. L'intima.....	33
1.1.2. La media.....	34
1.1.3. L'adventice.....	35
1.2. La Matrice Extracellulaire	35
1.2.1. Les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes	36
1.2.2. Les glycoprotéines de structure.....	37
1.2.3. Les collagènes.....	37
1.2.3.1. Généralités.....	37
1.2.3.2. Les collagènes fibrillaires	38
1.2.4. L'élastine.....	39
1.3. Les fibres élastiques : élément clef de la paroi vasculaire	40
1.3.1. Organisation du gène de la tropoélastine	41
1.3.2. La formation des fibres élastiques.....	43

1.3.2.1.	Synthèse et incorporation des monomères de tropoélastine	43
1.3.2.2.	Coacervation de la tropoélastine.....	44
1.3.2.3.	La formation des liaisons croisées	44
1.3.2.4.	L'élastine mature	46
1.3.3.	Les autres composants des fibres élastiques.....	47
1.3.3.1.	Les microfibrilles.....	47
2.	La paroi vasculaire au cours de l'IRC	49
2.1.	Le remodelage vasculaire au cours de l'IRC : athérosclérose et calcifications vasculaires	49
2.1.1.	L'athérosclérose.....	49
2.1.1.1.	Les étapes de son développement.....	49
2.1.1.2.	Les différents types de lésions.....	51
2.1.1.3.	Les mécanismes de l'athérosclérose potentialisés au cours de l'IRC	55
2.1.2.	Les calcifications vasculaires au cours de l'IRC.....	56
2.2.	L'élastolyse et les produits associés : acteurs clefs dans le remodelage vasculaire	60
2.2.1.	Les différentes élastases.....	60
2.2.2.	Les produits issus de l'élastolyse: les EDPs.....	61
2.2.3.	Les récepteurs des EDPs	62
2.2.3.1.	La galectine-3 et les intégrines $\alpha V\beta_3$ et $\alpha V\beta_5$	62
2.2.3.2.	Le Complexe Récepteur de l'Élastine (CRE).....	63
2.2.3.2.1.	La sous-unité de liaison des EDPs : l' <i>Elastin Binding Protein</i> (EBP).....	64
2.2.3.2.2.	La sous-unité associée à la membrane plasmique: la <i>Protective Protein Cathepsin A</i> (PPCA)	65
2.2.3.2.3.	La sous-unité catalytique : la neuraminidase-1 (Neu-1)	65
2.2.4.	Les voies de signalisation intracellulaires du Complexe Récepteur de l'élastine	66
2.2.5.	Rôles biologiques des peptides l'élastine au cours des pathologies vasculaires associées à l'IRC	68
2.2.5.1.	Athérosclérose	68
2.2.5.2.	Les calcifications vasculaires	71
C.	Le récepteur aux produits de glycation avancée (RAGE) : implication dans les processus liés à l'IRC	71
1.	Organisation structurale de RAGE.....	72
2.	Les différents mécanismes impliqués dans la régulation de RAGE.....	74

2.1.	Régulation au niveau transcriptionnel.....	74
2.2.	Régulation par épissage alternatif.....	75
2.3.	Régulation au niveau de la protéine.....	75
2.3.1.	Glycosylation.....	75
2.3.2.	Clivage protéolytique de RAGE.....	76
3.	Les ligands de RAGE.....	76
3.1.	AGEs : les produits de glycation avancés.....	76
3.2.	Les autres ligands.....	79
3.2.1.	Sérum Amyéloïde A.....	79
3.2.2.	High Mobility Group Box protein-1 (HMGB-1).....	79
3.2.3.	Les protéines de la famille de S100.....	80
4.	Signalisation.....	80
5.	Rôle de RAGE dans le remodelage vasculaire pathologique.....	82
5.1.	Implication de RAGE dans le développement de l'athérosclérose.....	82
5.2.	RAGE : un acteur clef dans les processus de calcifications vasculaires.....	83
D.	La cathepsine S : une protéase matricielle impliquée dans le remodelage vasculaire.....	84
1.	Généralités.....	84
2.	Du gène à la protéine.....	85
3.	Structure moléculaire et fixation des ligands.....	86
4.	Localisation et régulation de l'expression de la Cathepsine S.....	88
4.1.	Expression cellulaire et tissulaire de la Cathepsine S.....	88
4.2.	Régulation de l'activité de la CathS.....	89
5.	Rôles physiologiques et pathologiques de la Cathepsine S.....	90
5.1.	Rôles physiologiques.....	90
5.1.1.	Rôle dans la régulation protéique.....	90
5.1.2.	Rôle dans la réponse immunitaire.....	90
5.1.3.	Rôle dans l'adhésion et l'invasion cellulaire.....	91
5.1.4.	Rôle dans l'angiogenèse.....	91
5.1.5.	Rôle dans le remodelage matriciel.....	92
5.2.	Implication dans les pathologies cardiovasculaires.....	92
5.2.1.	Rôle de la CathS dans l'anévrisme aortique abdominal.....	92

5.2.2.	Rôle de la CathS au cours de l'IRC : implication dans le développement de l'athérosclérose et les calcifications vasculaires	93
II.	But et hypothèse de l'étude.....	96
III.	Matériels et méthodes	100
A.	La culture cellulaire.....	100
1.	Le modèle cellulaire : les MOVAS-1.....	100
1.1.	Les conditions de cultures des MOVAS-1.....	100
1.2.	Le traitement des MOVAS-1	101
1.2.1.	Stimulation des MOVAS-1 avec un ligand de RAGE : le S100A12	101
1.2.2.	Stimulation des MOVAS-1 par des peptides d'élastine synthétiques	101
1.2.3.	Stimulation avec du Phosphate inorganique (Pi).....	102
1.2.4.	Les différents inhibiteurs utilisés	102
1.2.4.1.	Inhibiteurs de Neu-1	102
1.2.4.2.	Inhibiteur de la fixation des EDPs : le chondroïtine sulfate	103
B.	Étude de l'activité protéolytique de la CathS sur de l'élastine insoluble et la tropoélastine.....	104
1.	Digestion de l'élastine insoluble et de la tropoélastine par la cathepsine S	104
1.1.	Purification d'élastine insoluble et obtention de la tropoélastine.....	104
1.1.1.	Purification de l'élastine insoluble selon la méthode de Schmelzer.....	104
1.1.2.	Purification de l'élastine insoluble selon la technique de Lansing.....	105
1.1.3.	Obtention de la tropoélastine recombinante.....	106
1.2.	Digestion de l'élastine insoluble et de la tropoélastine par la Cathepsine S	106
2.	Analyse de l'activité élastolytique de la cathepsine S.....	107
2.1.	Analyse par microscopie électronique à balayage de l'influence de la cathepsine S sur l'organisation ultrastructurale de l'élastine purifiée	107
2.2.	Étude par spectrométrie de masse des peptides d'élastine produits au cours de la digestion ...	107
C.	Étude de la différenciation ostéogénique.....	108
1.	Étude des calcifications <i>in vitro</i>	108
1.1.	Mise en évidence des calcifications par la coloration au rouge alizarine.....	108
1.2.	Analyse de l'expression de marqueurs ostéogéniques	109
1.2.1.	Étude protéique	109
1.2.1.1.	Extraction des protéines.....	109

1.2.1.2.	Analyse par western blot	109
1.2.2.	Étude de l'expression des ARN messager (ARNm).....	110
1.2.2.1.	Extraction des ARNs	110
1.2.2.2.	Dosage et vérification des ARNs.....	111
1.2.2.3.	Rétrotranscription des ARNs et PCR de vérification	111
1.2.2.4.	qPCR	114
2.	Mise au point d'un modèle <i>ex vivo</i> d'anneaux aortiques	115
D.	Analyse de l'expression de la Cathepsine S	116
E.	Analyse <i>in vivo</i> des complications cardiovasculaires associées à l'IRC et étude des acteurs moléculaires 117	
1.	Induction de l'IRC	117
2.	Inhibition de l'expression de RAGE <i>in vivo</i>	118
3.	Analyse <i>in vivo</i> de l'expression de RAGE	118
4.	Analyse <i>in vivo</i> de l'activité des cathepsines et des calcifications	119
4.1.	La Tomographie moléculaire de fluorescence	119
4.2.	Quantification de la fluorescence.....	120
5.	Analyses immunohistochimiques.....	120
6.	Étude la rigidité artérielle.....	121
7.	Analyse des fibres élastiques	123
8.	Évaluation de l'influence des EDPs issus de l'activité de la CathS sur le développement des calcifications vasculaires et de l'inhibition de Neu-1	123
8.1.	Évaluation de l'influence des EDPs issus de l'activité de la CathS sur le développement des calcifications vasculaires	123
8.2.	Utilisation d'un inhibiteur de Neu-1 : le Tamiflu®	123
9.	Dosage de la CathS sérique.....	124
F.	Analyses statistiques.....	125
IV.	Résultats.....	127
A.	RAGE : un acteur clef dans le remodelage et les calcifications vasculaires.....	127
1.	Caractérisation des modèles <i>in vivo</i>	127
2.	Étude du rôle de RAGE dans le remodelage vasculaire au cours de l'IRC : acteur clef dans la survenue des calcifications et l'élastolyse vasculaire.	129
3.	RAGE, un potentiel inducteur de la CathS au cours de l'IRC ?.....	134

B.	La Cathepsine S : une protéase impliquée dans le remodelage de l'élastine et la production d'EDPs potentiellement bioactifs	138
1.	Analyse de la dégradation de l'élastine insoluble vasculaire par la CathS	138
2.	Caractérisation des sites de clivages préférentiels pour la CathS vis-à-vis de deux types d'élastine insoluble	146
C.	Rôle des EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS sur les processus de calcifications vasculaires	148
1.	Impact des EDPs sur l'ostéodifférenciation des CMLs.....	148
2.	Le CRE, relais moléculaire impliqué dans les effets pro-calcifiants des EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS	154
2.1.	Influence du DANA et de CS sur les calcifications induites par les EDPs sélectionnés.....	154
2.2.	Analyse des relations structure/fonction des EDPs sélectionnés	156
3.	Impact des EDPs sélectionnés sur la survenue de calcifications vasculaires <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i>	162
3.1.	Impact des EDPs sélectionnés sur la survenue de calcifications <i>ex vivo</i>	162
3.2.	Impact des EDPs sélectionnés sur la survenue de calcifications <i>in vivo</i>	163
4.	Étude de l'influence de P1 sur l'expression de la CathS : existence d'une boucle d'amplification .	167
D.	Étude préliminaire du ciblage pharmacologique de Neu-1 au cours de l'IRC.....	170
V.	Discussion _ Conclusions _ Perspectives	178
VI.	Communications	196
VII.	Références bibliographiques.....	199

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGE	<i>Produit de glycation avancé</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
Akt	Protéine Kinase B
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
ApoE	Apolipoprotéine E
ARN	Acide RiboNucléique
BET	Bromure d'ETHidium
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CathS	Cathepsine S
cbEGF	<i>calcium-binding Epidermal Growth Factor</i>
CE	Cellules Endothéliales
c-JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CML	Cellules Musculaire Lisse
CPE	Cellule Progénitrice Endothéliale
CRE	Complexe Récepteur de l'Elastine
CRP	Protéine C-Réactive
CS	<i>Chondroïtin sulfate</i>
c-Src	c-sarcome
DPA	Dialyse Péritonéale Automatisée
DPCA	Dialyse Péritonéale Continue Ambulatoire

DFG	Débit de filtration glomérulaire
DKO	<i>Double knockout</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTP	deoxyriboNucléotide TriPhosphate
DTT	Dithiotréitol
EBP	<i>Elastin Binding Protein</i>
EDPs	<i>Elastin-Derived Peptides</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetra acetic Acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGR-1	<i>Early Growth Response-1</i>
ELN	Elastine
EMILIN	<i>Elastin Microfibril Interface Located Protein</i>
eNOS	<i>endothelial NO Synthase</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
fl-RAGE	<i>full length RAGE</i>
FMT	<i>Fluorescence Molecular Tomography</i>
GAG	Glycosaminoglycane
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HMGB1	<i>High Mobility Group Box 1</i>
HS	<i>Heparan sulfate</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromotagraphy</i>
IAA	IsoAmylic Alcohol
ICAM-1	<i>IntraCellular Adhesion Molecule-1</i>
IL-6	Interleukine-6
IL- β	Interleukine-1 β

INF- γ	<i>Interféron-gamma</i>
IRC	Insuffisance Rénale Chronique
IRF-1	<i>IFN response factor-1</i>
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
KS	Keratane sulfates
LacCer	Lactosylcéramide
LDLox	<i>Low density lipoprotein oxydé</i>
LDLR	<i>LDL receptor</i>
LDLs	<i>Low density lipoprotein</i>
LHVS	<i>morpholinurea-leucine-homophenylalanine-vinyl phenyl sulfone</i>
LLC	<i>Large Latency Complex</i>
LOX	Lysyl oxydase
LTBP	<i>Latent TGF-β binding protein</i>
MAGP	<i>Microfibril-associated glycoprotein</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
MCSF	<i>Monocyte-Colony Stimulating Factor</i>
mDia1	<i>Diaphanous related formin 1</i>
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MGP	<i>Matrix-Gla-Protein</i>
MMPs	<i>Matrix MetalloProteinases</i>
MRC	Maladie rénale chronique
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NEM	N-EthylMaleimide
NEU-1	Neuraminidase-1
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NO	Monoxyde azote

OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i>
OPN	Ostéopontine
p/v	poids/volume
PAF	PAraFormaldéhyde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerization Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PG	Protéoglycane
Pi	Phosphate inorganique
PI3K γ	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
Pit	co transporteur phosphate/sodium
PKA	Protéine kinase A
PMSF	<i>PhenylMethylSulfonyl Fluorure</i>
PPCA	<i>Protein Protective Cathepsin A</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End-Product</i>
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RGD	Arginine, Glycine, Aspartate
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RunX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SAA	<i>Serum Albumin A</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SLPI	<i>Secretory Leuko Protease Inhibitor</i>
SM22 α	<i>Smooth Muscle 22 alpha</i>
SP	Sérum physiologique
sRAGE	<i>soluble RAGE</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>

TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCA	<i>TriChloroacetic Acid</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TK	<i>Thymidine Kinase</i>
TLR	<i>Toll-Like-Receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
v/v	volume/volume
VCAM-1	<i>Vascular Chemoattractant Adhésion Molecule-1</i>
VEGF-C	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-C</i>
VoP	Vitesse d'onde de Pouls
α SMA	<i>α Smooth Muscle Actin</i>

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie et fonctionnement rénal.....	25
Figure 2 : Répartition des maladies rénales évoluant vers une IRC terminale en France.	29
Figure 3 : Les différents modalités de traitements utilisées en France en 2016.....	31
Figure 4 : Représentation schématique la paroi vasculaire	33
Figure 5 : Représentation schématique de la formation des fibres de collagène.....	39
Figure 6 : Représentation schématique d'une fibre élastique.....	40
Figure 7 : Organisation des fibres élastiques selon le tissu	40
Figure 8 : Organisation des différents exons présents dans le gène de l'élastine.....	42
Figure 9 : Rôle du recyclage de l'EBP lors de la formation de la fibre élastique	43
Figure 10 : Formation des liaisons croisées formées entre les monomères de tropoélastine	45
Figure 11 : Représentation schématique du processus d'élastogénèse.....	46
Figure 12 : Représentation schématique de la formation de la plaque d'athérome.....	51
Figure 13 : Représentation schématique des différents types de lésions d'athérome.....	54
Figure 14 : Proportion des différentes stades de l'athérosclérose en fonction de la valeur du DFG.....	54
Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme impliqué dans le développement des calcifications vasculaires.....	59
Figure 16 : Conformation du coude β de type VIII retrouvé au sein des EDPs bioactifs	62
Figure 17 : Représentation schématique du Complexe Récepteur de l'Élastine	63
Figure 18 : Représentation schématique de l'obtention de l'EBP à partir de l'ARNm de la β - galactosidase.....	64
Figure 19 : Représentation schématique des différentes voies de signalisations induites lors de l'activation du CRE par les EDPs	67
Figure 20 : Résumé de l'influence des EDPs libérés sur les différents mécanismes impliqués dans l'athérosclérose : données <i>in vitro</i>	70
Figure 21 : Représentation schématique de la protéine.....	72
Figure 22 : Schéma représentatif des différents isoformes de RAGE.....	74
Figure 23 : Schéma représentatif des différentes voies de formation des AGEs <i>in vivo</i>	77
Figure 24 : Schéma représentatif du processus de formation des AGEs par glycation endogène.....	78
Figure 25 : Schéma des voies de signalisation principales activées après fixation d'un ligand sur RAGE.....	81
Figure 26 : Organisation du gène de la CathS, CTSS.	85
Figure 27 : Schéma illustratif de la nomenclature de Schechter et Berger.....	87
Figure 28 : Modélisation de la structure 3D de la CathS.....	88
Figure 29 : Structure chimique du DANA	103

Figure 30 : Structure chimique du Chondroïtine Sulfate.....	103
Figure 31 : Schéma d'un cycle d'amplification de PCR	113
Figure 32 : Schéma de fonctionnement du FMT.....	120
Figure 33 : Représentation des signaux obtenus au niveau de l'aorte et de la crosse aortique	122
Figure 34 : Structure chimique du Tamiflu®	124
Figure 35 : Schéma illustratif de la procédure suivie pour induire une IRC	127
Figure 36: Étude de l'expression de RAGE dans nos modèles animaux	128
Figure 37 : Analyse des plaques d'athérome dans notre modèle ApoE ^{-/-} d'IRC.....	129
Figure 38 : Analyse du rôle de RAGE dans la survenue des calcifications vasculaires.....	131
Figure 39 : Analyse de l'élastolyse vasculaire et quantification du nombre de ruptures présentes au sein des fibres	133
Figure 40 : Analyse du rôle de RAGE dans l'expression de la CathS <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	137
Figure 41 : Impact de l'activité protéolytique de la CathS sur la morphologie de l'élastine insoluble	140
Figure 42 : Analyse des peptides produits suite à la digestion de la tropoélastine et d'élastines insolubles par la CathS.....	145
Figure 43 : Analyse des préférences de la CathS vis-à-vis des résidus P1-P4 et P'1-P'4 des substrats utilisés.....	146
Figure 44 : Les EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS accélèrent les calcifications <i>in vitro</i> en conditions hyperphosphatémiques	150
Figure 45 : Influence des EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS sur l'expression des marqueurs d'ostéodifférenciation et de CMLs	153
Figure 46 : Impact des différents inhibiteurs du CRE sur les calcifications <i>in vitro</i> induites par les EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS.	155
Figure 47 : Modèle de docking du VGVAPG sur l'EBP utilisé pour l'étude des interactions EDPs sélectionnés/EBP.....	157
Figure 48 : Visualisation de l'interaction des EDPs sélectionnés dans le site de fixation de l'EBP ...	158
Figure 49 : Évaluation de la distance entre les EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS et un modèle d'hydroxyapatite par dynamique moléculaire	160
Figure 50 : Détermination de l'énergie de liaison avec un modèle d'hydroxyapatite pour chaque EDP	161
Figure 51 : Analyse des effets pro-calcifiants des EDPs provenant de l'activité élastolytique de la CathS dans un modèle <i>ex vivo</i> d'anneaux aortiques.	163
Figure 52 : Analyse des effets de P1 sur le développement des calcifications vasculaires <i>in vivo</i>	166
Figure 53 : Dosage sérique de la CathS	167
Figure 54 : Influence de P1 et du Pi sur l'expression de la CathS par les CMLs.....	169

Figure 55 : Schéma illustratif de l'inhibition de Neu-1 par le Tamiflu® et conséquence sur les activités signalétique et biologique associées.....	171
Figure 56 : Impact du Tamiflu® sur le développement des calcifications vasculaires.	173
Figure 57 : Influence du Tamiflu® sur l'expression de la CathS au cours de l'IRC.....	174
Figure 58 : Influence du Tamiflu® sur l'évolution de la rigidité artérielle..	175
Figure 59 : Influence du Tamiflu® sur l'évolution de la fréquence cardiaque.	176

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique.....	28
Tableau 2 : Les différentes amorces utilisées pour la qPCR	115
Tableau 3 : Dosage de différentes variables biochimiques dans le sérum de souris ApoE ^{-/-} Sham et ApoE ^{-/-} IRC après 17 semaines (n= 14).....	128
Tableau 4 : Tableau de score HADDOCK reflétant les résultats obtenus par docking moléculaire ...	159

Introduction

I. Introduction

A. L'insuffisance Rénale Chronique

1. Généralités

Le rein est l'organe majeur impliqué dans la régulation de l'homéostasie de l'ensemble de notre organisme. Sa principale fonction est la filtration du sang afin d'éliminer les métabolites cellulaires ce qui permet l'ajustement de l'eau et des sels minéraux ainsi que du pH. Le rein participe également à régulation de la pression sanguine par le système rénine-angiotensine, à la production des érythrocytes et il participe au maintien des taux circulants de calcium et de phosphate. L'unité fonctionnel du rein est le néphron avec le corpuscule rénal situé dans sa partie proximale. Dans cette partie, le système vasculaire est un enchevêtrement de vaisseaux sanguins peu étanches formant le glomérule entouré de la capsule de Bowman (Figure 1A). D'un point de vue cellulaire, les cellules mésangiales, situées entre les capillaires, assurent la porosité et l'intégrité du système vasculaire. Cette organisation du rein permet de retenir seulement les petites molécules telles que l'eau, les ions et les déchets passant à travers une succession de membranes. La première est l'endothélium poreux du glomérule puis ces molécules rencontrent la membrane basale glomérulaire et enfin elles doivent traverser un tapis fenestré par la présence de podocytes (Figure 1B) (1,2).

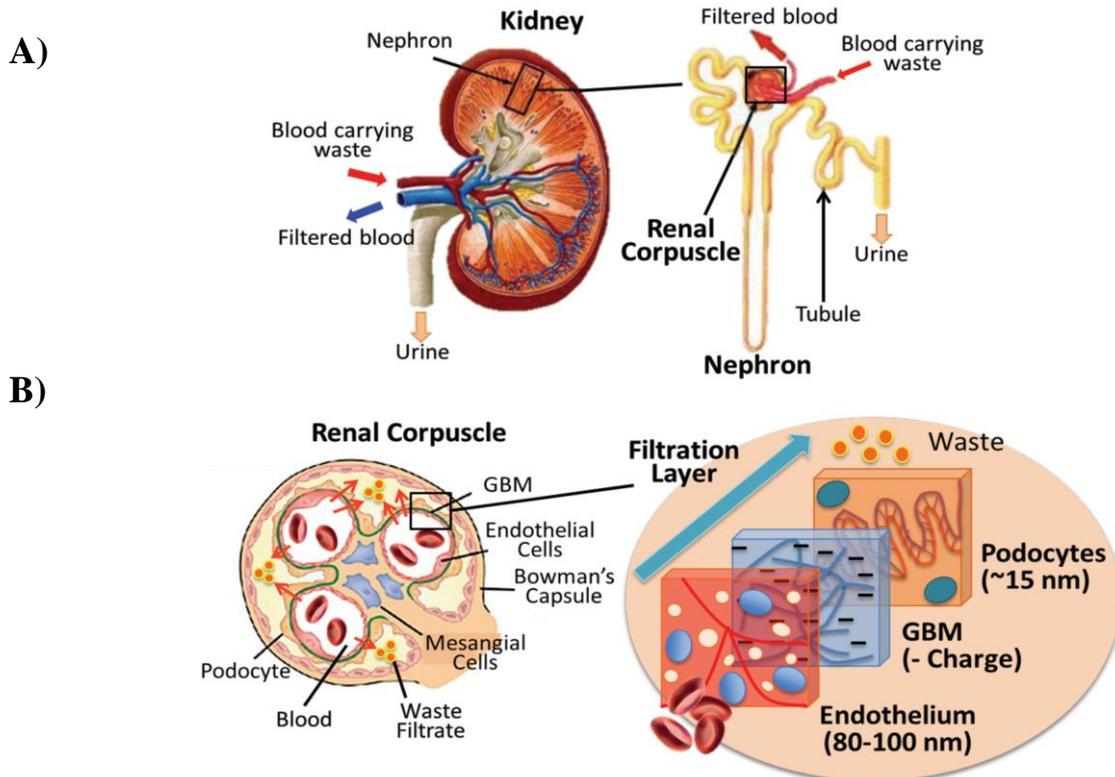


Figure 1 : Anatomie et fonctionnement rénal. A) : Le rein est formé de néphrons qui sont l'unité de filtration de cet organe. B) : Le glomérule est constitué d'un réseau de vaisseaux permettant l'apport du sang dans le corpuscule rénal entouré de la capsule Bowman. Les déchets doivent traverser 3 étape de filtration : l'endothélium, la membrane basale du glomérule (GBM) et le diaphragme de fente avec les podocytes (2).

Le développement de maladies vasculaires comme le diabète ou l'hypertension peuvent être à l'origine d'une altération des reins menant à long terme à l'apparition de l'insuffisance rénale chronique (IRC). Elle résulte d'une altération de la structure rénale, du fonctionnement des reins, voire les deux combinés. L'altération structurale peut être causée par des malformations ou un cancer contrairement au dysfonctionnement rénal qui peut être le résultat d'une hypertension ou d'un œdème (3). Ainsi, lorsque la fonction rénale passe sous un seuil critique, défini comme l'IRC terminale, l'homéostasie n'est plus maintenue et le recours au traitement de suppléance comme la dialyse ou la transplantation est alors vital. Cette pathologie détériore la qualité de vie des patients et diminue fortement l'espérance de vie.

2. Épidémiologie

L'IRC terminale est la principale cause de décès dans le monde touchant entre 10 et 15% de la population (4). En 2010, le nombre de personnes atteintes d'IRC terminale ayant reçu une greffe est d'environ 2,62 millions et environ 2,05 millions de patients ont commencé

un traitement par dialyse. Au cours de cette même année, entre 2,3 et 7,1 millions de personnes sont décédées parce qu'elles n'ont pas pu recevoir un traitement de suppléance. Il a été ainsi estimé que le nombre de personnes ayant besoin d'une greffe rénale soit doublé d'ici 2030 (5).

En 2016, il a été estimé qu'environ 7 à 10 % de la population française présentait une atteinte rénale. Ainsi, il a été dénombré que 84 638 personnes étaient en traitement pour une IRC terminale dont 45% avaient reçu une greffe rénale et 55% étaient en dialyse. Cependant, au cours de cette année, 7 920 patients sont décédés, dont 7 134 étaient en dialyse avec un âge moyen de 79,6 ans, le reste ayant reçu une greffe rénale avec une moyenne d'âge de 69,1 ans. Parmi les patients qui ont débuté un traitement en 2016, il a été estimé que 36% sont des femmes contre 64% pour les hommes. La moitié de ces patients étaient âgés de moins de 71 ans. Enfin, il a également été estimé que 60% de la totalité des patients étaient atteints d'une maladie cardiovasculaire associée à l'IRC terminale (6).

3. Diagnostic et évolution de la pathologie

L'IRC est caractérisée par une diminution permanente du débit de filtration glomérulaire (DGF) sous une valeur normale définie en fonction de l'âge et du sexe. L'IRC a été identifiée comme la complication la plus grave des maladies rénales chroniques (MRC). Sa sévérité est évaluée en termes de stade croissant en fonction de la valeur du DGF qui est un reflet réel du fonctionnement global des reins.

3.1. Outils de diagnostic et détermination du stade de la maladie

La détermination de la valeur du Débit de Filtration Glomérulaire (DFG, exprimé en mL/min/1,73 m²), est réalisée par la mesure de la clairance de traceurs exogènes filtrés par le glomérule mais qui ne sont pas métabolisés, ni réabsorbés, ni sécrétés dans le tubule rénal comme l'inuline, l'iothalamate ou l'iohexol. Cependant, il est le plus souvent estimé à partir de la mesure de la créatinine sérique rapportée dans diverses formules prenant en compte l'âge, le poids, la taille ainsi que l'ethnie.

Parmi les formules utilisées, on trouve les 3 formules suivantes :

➤ La formule de Cockcroft et Gault :

$$DFG = \frac{(140 - \text{âge})}{\text{Créatinémie } (\mu\text{mol/l})} \times \text{poids} \times f$$

où f = 1,23 chez l'homme ou 1,04 chez la femme

Ce type de formule présente quelques inconvénients avec la nécessité de peser le patient, une sous-estimation de DFG chez les personnes maigres ou âgées de plus de 75 ans et au contraire une surestimation chez les personnes obèses.

➤ La formule de MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) :

$$\text{DFG} = 175 \times (\text{Créatininémie en } \mu\text{mol/L} \times 0,0113)^{-1,154} \times \text{âge}^{-0,203} \\ \times 0,742 \text{ (si femme) ou } 1,212 \text{ (si patient de couleur)}$$

Le taux d'imprécision de cette formule est élevé puisqu'environ 30 % des patients ont été classés dans un stade de maladie rénale inapproprié suite à une étude sur la performance prédictive de cette formule.

➤ La formule de CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration*) :

$$\text{DFG} = a \times (\text{créatinémie en mg/dL/b})^c \times (0.993)^{\text{âge}}$$

Avec les paramètres suivants :

a = 166 (femme noire), 163 (homme noir), 144 (femme blanche), 141 (homme blanc)

b = 0.7 (femme), 0.9 (homme)

c = -0.329 (femme avec créatinine ≤ 0.7 mg/dL), -1.209 (femme avec une créatinine > 0.7 mg/dL), -0.411 (homme avec créatinine ≤ 0.9 mg/dL), -1.209 (homme avec créatinine > 0.9 mg/dL)

Cette formule est recommandée par la Haute Autorité de Santé afin d'estimer le DFG car elle a été identifiée comme l'équation la plus performante.

Afin de préciser la nature de la maladie rénale, il faut la présence d'une protéinurie, l'existence de sédiments urinaires (hématurie, leucocyturie) et enfin une anomalie morphologique des reins ou des voies urinaires associées à un DFG en dessous de la valeur basale. Le caractère chronique de la maladie rénale est défini comme évoluant depuis plus de 3 mois.

La mesure de DGF ou son estimation permet de définir le stade de la maladie rénale chronique dont l'évolution se découpe en 5 stades. Ce classement en stades évolutifs de la maladie permet d'adapter le traitement au patient (Tableau 1).

Stade	DFG (mL/min/1,73 m ²)	Définition
1	≥ 90	Maladie rénale chronique* avec DFG normal ou augmenté
2	Entre 60 et 89	Maladie rénale chronique* avec DFG légèrement diminué
3A	Entre 45 et 59	Insuffisance rénale chronique modérée
3B	Entre 30 et 44	
4	Entre 15 et 29	Insuffisance rénale chronique sévère
5	< 15	Insuffisance rénale chronique terminale

Tableau 1 : Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique

* Avec marqueurs d'atteinte rénale : albuminurie, hématurie, leucocyturie, ou anomalies morphologiques ou histologiques, ou marqueurs de dysfonction tubulaire, persistant plus de 3 mois (et à deux ou trois examens consécutifs). D'après la Haute Autorité de Santé.

3.2. Impact des antécédents du patient

L'étiologie de la maladie rénale chronique est essentielle à déterminer afin de mettre en place une prise en charge thérapeutique spécifique adaptée au patient. Ce diagnostic étiologique comprend des examens cliniques et biologiques ainsi qu'un questionnaire concernant le patient. Ceci permet d'identifier des facteurs de risques cardiovasculaires de la MRC comme le diabète ou l'hypertension artérielle. Il prend également en compte les habitudes personnelles du patient avec la prise de molécules néphrotoxiques ou des antécédents familiaux de néphropathie.

Les maladies conduisant à l'IRC sont très variées tout comme le rythme de leur progression qui est différent d'un patient à un autre. Certaines maladies touchent primitivement les reins alors que d'autres touchent l'organisme entièrement comme le diabète ou l'hypertension artérielle avec des effets importants sur les reins. L'ensemble des maladies rénales responsables du développement d'une IRC terminale en France a été listé dans le rapport annuel sur l'incidence et la prévalence de l'IRC terminale établi par le programme REIN (Réseau Épidémiologie et Information en Néphrologie). Ainsi il s'est avéré que les néphropathies diabétiques et l'hypertension artérielle sont responsables de 47 % des IRC terminales. Les glomérulonéphrites, les néphropathies interstitielles et héréditaires participent aussi dans le développement des IRC terminales en France (Figure 2).

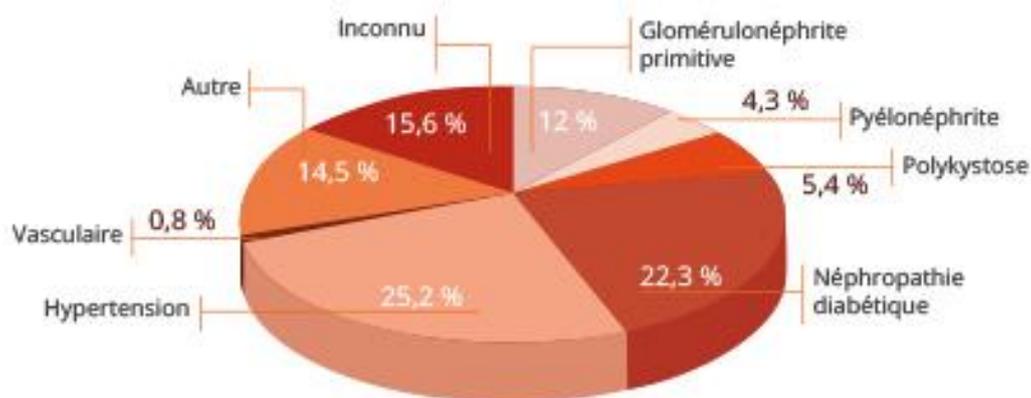


Figure 2 : Répartition des maladies rénales évoluant vers une IRC terminale en France, D'après le rapport annuel REIN 2015.

3.3. Évaluation de la progression de la maladie rénale chronique

Il est essentiel de suivre la progression de la maladie vers un stade terminal. Pour cela, la vitesse de progression est suivie à partir du DFG en calculant le déclin annuel du DFG en utilisant la formule suivante : $DFG_{année_n} - DFG_{année_{n+1}}$. Il est évalué avec les repères suivants :

- déclin annuel " physiologique " observé après 40 ans : $< 2 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{an}$,
- déclin annuel " modéré " : $\geq 2 \text{ et } < 5 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{an}$,
- déclin annuel " rapide " : $\geq 5 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{an}$

À cela s'ajoute, la présence et l'importance de l'albuminurie qui permet également d'apprécier l'évolution de la maladie ainsi qu'une pression artérielle élevée soutenue dans le temps.

Afin de ralentir l'évolution de la maladie, divers points de contrôle doivent être mis en place. Le contrôle de la pression artérielle permet de ralentir la progression de la maladie rénale chronique ainsi que de prévenir les complications cardiovasculaires associées à cette pathologie. De même, la diminution modérée d'apport en protéine permet de limiter la progression de l'IRC. Ainsi un apport entre 0,8 et de 1 g/kg/jour est recommandé chez ces patients. La prévention des épisodes d'insuffisance rénale aigüe après une déshydratation, une prise de molécules néphrotoxiques ou l'apparition d'une obstruction ou encore le développement d'autres pathologies rénales est important afin de limiter l'aggravation de l'IRC. Une attention particulière doit être portée chez les patients atteints de diabète. En effet, cette surveillance est essentielle puisque l'hyperglycémie entraîne une vasodilatation

systémique et rénale responsable indirectement d'une augmentation de la filtration glomérulaire. Cela conduit à un épaissement de la membrane glomérulaire induisant une augmentation de l'excrétion urinaire de l'albumine. Cette hyperfiltration peut être accentuée par des lésions au niveau des podocytes, des cellules épithéliales de la chambre glomérulaire, des lésions tubulaires limitant la réabsorption de l'albumine filtrée. Cependant, ce mécanisme peut être renversé si l'hyperglycémie est contrôlée et dans le cas contraire, les lésions glomérulaires et tubulaires deviendront définitives menant à l'apparition de l'IRC. Enfin, l'arrêt du tabac est vital chez les patients atteints de MRC afin de limiter sa progression.

4. Les différents traitements

Un patient avec DFG inférieur à 15 ml/min/1,73 m² est atteint d'IRC terminale. Il est alors nécessaire pour la survie des patients de mettre en place un traitement de suppléance de la fonction rénale. Il existe 3 types de traitements différents : la transplantation rénale, l'hémodialyse et la dialyse péritonéale.

La transplantation rénale est la meilleure méthode de suppléance de la fonction rénale comparée aux deux autres méthodes disponibles. En effet, elle améliore considérablement la qualité de vie des patients et augmente leur espérance de vie. La seule limite de la mise en œuvre de ce traitement est la disponibilité limitée des greffons. En effet, d'après le rapport annuel REIN 2016, 13 431 personnes ont été recensées sur la liste nationale d'attente et seulement 3 615 patients ont bénéficiés d'une greffe rénale. La transplantation peut se réaliser avant le passage par la dialyse, c'est ce qu'on appelle la greffe préemptive. Ce sont les greffes qui fonctionnent le mieux sur le plan médical mais également sur le plan social puisqu'elles évitent les problèmes socio-professionnels de la dialyse.

L'épuration extra-rénale regroupant l'hémodialyse et la dialyse péritonéale est le traitement mis en place en premier. L'hémodialyse est la technique la plus utilisée en France avec une augmentation de l'espérance de vie de 20 ans. Cependant, c'est une technique très contraignante puisqu'elle nécessite entre 4 et 6 h de traitement et doit être réalisée 3 fois par semaine. Elle utilise une voie vasculaire permettant l'échange entre le sang et une solution de dialyse en traversant une membrane artificielle. Cela permet l'extraction des protéines azotées et des toxines urémiques. Enfin la technique de dialyse péritonéale est largement moins utilisée en France (Figure 3). Elle est pourtant moins coûteuse et plus tolérée par les patients que la technique précédente et elle est plus compatible avec la dialyse à domicile. Elle utilise ainsi le

péritoine comme filtre en posant chirurgicalement un cathéter de dialyse pour l'échange entre le sang et la solution de dialyse.

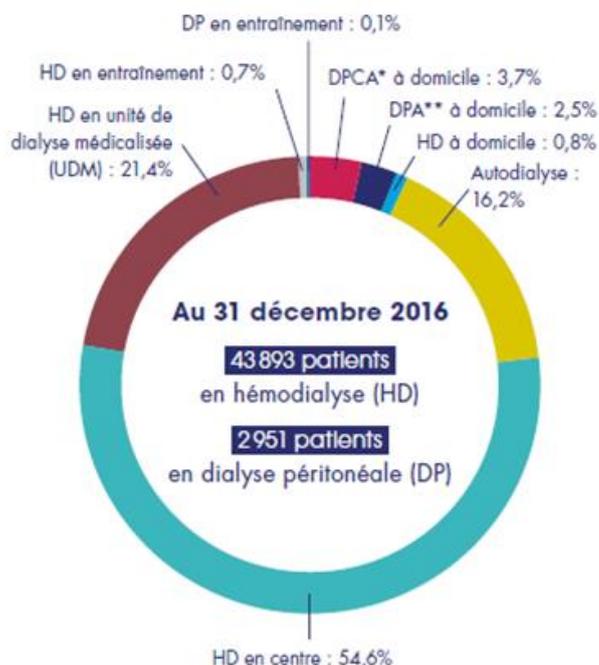


Figure 3 : Les différents modalités de traitements utilisées en France en 2016

D'après le rapport annuel REIN 2016

DPA : Dialyse Péritonéale Automatisée, DPCA : Dialyse Péritonéale Continue Ambulatoire

5. Les complications cardiovasculaires associées à l'Insuffisance Rénale Chronique

Les complications cardiovasculaires sont les conséquences de l'IRC les plus sévères puisqu'elles sont responsables d'une morbidité et une mortalité élevées. En effet, il a été démontré une progression des événements cardiovasculaires avec la diminution du DFG (7). Parmi eux, l'insuffisance cardiaque est la complication la plus souvent retrouvée chez les patients urémiques comparé à la population générale. Elle est alors identifiée comme un facteur de risque indépendant de la mortalité de l'IRC (8). Il a également été mis en évidence que les maladies coronariennes participent au décès de 40 à 50% des personnes urémiques sous dialyse (9). L'ensemble de ces complications sont le résultat de l'hypertension artérielle et du remodelage vasculaire associé à l'IRC. En effet, l'athérosclérose accélérée au cours de l'IRC entraîne le développement de lésions au niveau aortique et au sein des valves cardiaques. De plus, les dépôts calciques, plus particulièrement de phosphate de calcium de type hydroxyapatite touchant ces territoires vasculaires, favorise le développement de la rigidité

artérielle. Ainsi, les artères ne fonctionnent plus correctement menant à terme au développement de maladies cardiovasculaires (10). Les calcifications vasculaires aortiques représentent ainsi un facteur pronostique fort de mortalité chez les personnes sous dialyse (11).

Nous allons donc, dans cette partie, détailler la physiologie de la paroi vasculaire puis son remodelage pathologique au cours de complications cardiovasculaires. Enfin, nous précisons les mécanismes spécifiques de l'IRC qui interviennent dans ce processus de remodelage artérielle.

B. Modification de la paroi vasculaire au cours de l'IRC

L'IRC entraîne le développement de nombreuses complications vasculaires qui sont associées à un remodelage important de la paroi des vaisseaux sanguins appelé vasculopathie urémique. Parmi ces modifications, l'accumulation de lipides et le développement de calcifications vasculaires induisent une rigidification des vaisseaux sanguins altérant profondément leurs fonctions physiologiques.

1. La paroi vasculaire normale

Le système cardiovasculaire est constitué du cœur, des artères, des artérioles, des capillaires, des veinules et des veines. Son rôle est d'apporter l'oxygène et les nutriments aux différents organes et tissus grâce aux artères, artérioles et capillaires. Les veinules et les veines permettant le retour du sang au cœur pour son renouvellement.

La paroi vasculaire est composée de 3 tuniques concentriques (de la lumière vers la périphérie) nommées intima, média et adventice, chacune étant séparée par des limitantes élastiques. La limitante élastique interne sépare l'intima de la média et la limitante élastique externe sépare la média et l'adventice (12) (Figure 4).

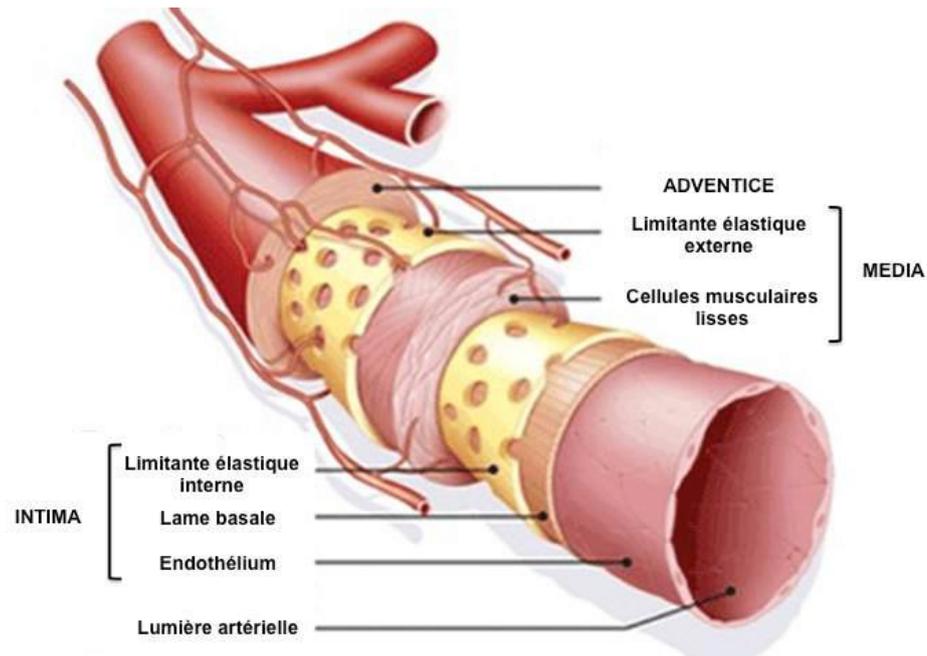


Figure 4 : Représentation schématique la paroi vasculaire. *L'intima est composée de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale, ainsi que de la limite élastique interne créant une séparation avec la media. Cette dernière est composée de cellules musculaires lisses entourées de matrice extracellulaire. L'adventice est composée de fibroblastes et de matrice extracellulaire. (Sanofi aventis)*

1.1. Composition cellulaire

1.1.1. L'intima

Cette couche correspond à la tunique la plus interne des vaisseaux sanguins au contact direct de la circulation sanguine. Elle se compose de cellules endothéliales (CE) reposant sur une membrane basale (13,14). L'endothélium forme un revêtement pavimenteux constitué par des CE aplaties qui sont plus épaisses au niveau des artères de gros diamètre comme l'aorte comparées aux vaisseaux de la microcirculation.

L'endothélium est un organe paracrine et endocrine possédant de nombreuses fonctions métaboliques et synthétiques. En effet, il régule les processus de coagulation, l'adhérence des plaquettes, le flux sanguin ainsi que le tonus vasculaire, la réponse inflammatoire et immunitaire par le contrôle des interactions avec les leucocytes, les monocytes, les lymphocytes et la production de MEC. Il joue également le rôle de barrière sélective contrôlant le passage des hormones, des cellules (plaquettes, cellules inflammatoires circulantes) et de fluides plasmatiques (eau, les électrolytes) (15–17).

Les CE sont des acteurs clés dans la régulation du phénotype des Cellules Musculaires Lisses (CMLs) de la média. Elles sécrètent en effet diverses molécules vasoactives telles que le

NO (monoxyde d'azote), provoquant une vasorelaxation, ou encore les leucotriènes induisant une vasoconstriction en réponse à un stimulus tel qu'une altération de la pression sanguine ou une variation de la concentration en ADP (18). La membrane basale sur laquelle repose les CE est constituée principalement de collagène de type IV, des laminines, de perlécane et de nidogène 1 et 2.

1.1.2. La media

Cette tunique est la plus épaisse des trois couches de la paroi vasculaire avec une composition différente en fonction des artères élastiques ou musculaires. Elle est composée principalement de CMLs entourées de MEC, notamment de fibres élastiques formant des unités lamellaires uniquement retrouvées dans les artères élastiques. Le nombre d'unités lamellaires est proportionnel au diamètre du vaisseau et des forces de cisaillement exercées sur la paroi du vaisseau (13,14,19).

Dans les artères élastiques, la média est constituée des CMLs entourée d'une MEC riche en protéoglycanes, collagènes et fibres élastiques. Ces dernières sont organisées sous forme d'anneaux concentriques lui permettant d'assurer la compliance du vaisseaux. En effet, elles se déforment sous l'effet de l'onde de pouls systolique puis reprennent leurs formes initiales au cours de la diastole tout en opposant une très faible résistance au flux sanguin.

Dans les artères musculaires, la média est formée d'élastine sous forme de fibres dans lesquelles les CMLs sont retrouvées. Le rôle principal de ces artères est de distribuer le sang avec un volume et une pression adaptés au niveau des capillaires.

Les CMLs, seul type cellulaire présent dans cette tunique, sont primordiales dans la relaxation et la contraction des artères grâce à leur cytoplasme riche en myofilaments dû à un phénotype contractile et peu prolifératif (20). Elles sont ancrées à la MEC par de nombreuses molécules d'adhésion comme des intégrines telles que l'intégrine $\alpha\beta3$ ce qui leur confère la capacité de supporter les tensions et les forces hémodynamiques s'exerçant sur la paroi (21). Les contractions des CMLs sont régulées grâce à des oscillations de calcium cytosolique générant des pulses calciques de façon périodique (22). Dans les conditions pathologiques, les CMLs peuvent changer de phénotype appelé " *switch* " phénotypique sous l'influence de divers stimuli comme l'augmentation de la pression artérielle, l'accroissement de la dégradation de la MEC ou encore des molécules libérées par les cellules environnantes. Elles passent donc d'un

phénotype contractile à un phénotype prolifératif ou synthétique avec une perte de certains marqueurs comme α Smooth Muscle Actin (α SMA) (21).

1.1.3. L'adventice

Cette couche est la plus externe de la paroi artérielle, située entre la média et le tissu adipeux péri-artériel. Son épaisseur varie en fonction des territoires artériels. Elle se compose de macromolécules matricielles de différentes familles (glycoprotéines, protéoglycanes, collagènes, élastine) (23). Cette couche est principalement composée de fibroblastes qui contrôlent la fonction vasculaire en intervenant dans la production, l'organisation et la dégradation de la MEC. Ils secrètent également des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines.

Cette couche contient également un ensemble de terminaisons nerveuses appelé nervi-vasorum et de vaisseaux nommés vaso-vasorum formant un ensemble de capillaires. Ils assurent l'apport en oxygène et en nutriments pour les cellules éloignées de la lumière artérielle. Le réseau de capillaire sanguin peut, au cours d'un épaissement pathologique de l'intima, pénétrer dans la média et l'intima suite à une néogénèse vasculaire (14).

1.2. La Matrice Extracellulaire

La MEC est une entité non-cellulaire formée d'un ensemble complexe et dynamique de macromolécules de nature protéique et/ou glucidique. Elle est présente dans l'ensemble des organes et tissus de l'organisme formant un réseau tridimensionnel. Son rôle est de fournir un support physique aux cellules mais elle participe également à de nombreux processus cellulaires et physiopathologiques. Ces mécanismes impliquent la libération de facteurs solubles tels que des facteurs de croissance, des interactions cellules/MEC intervenant dans les phénomènes de migration, d'adhésion, de prolifération, de différenciation et dans la survie cellulaire (24).

La MEC est composée de 4 familles de macromolécules représentées par les collagènes, l'élastine, les protéoglycanes et les glycoprotéines de structures (25). Les fibres de collagène et d'élastine s'organisent en un réseau dense assurant la résistance aux tensions, alors que les protéoglycanes et les glycoprotéines de structure forment un réseau relâché pour la résistance aux forces de compression (23). La composition de la MEC est variable en fonction du tissu ou de l'organe afin d'assurer des propriétés mécaniques spécifiques. Dans la paroi artérielle, la MEC

fournit une structure de soutien et assure les propriétés d'élasticité et de résistance à l'étirement importantes face aux fortes contraintes induite par la pression artérielle.

La MEC est soumise à un remodelage perpétuel alternant synthèse et dégradation. Concernant sa synthèse, ce sont principalement les CMLs qui synthétisent ces macromolécules au sein de la paroi des vaisseaux (25). Pour les phénomènes de protéolyse matricielle, de nombreuses enzymes protéolytiques ont été identifiées telles que métalloprotéinases matricielles (MMPs) (26), les protéases à sérine et les protéases à cystéine comme les cathepsines (27). Dans les conditions physiologiques comme la cicatrisation ou la vieillissement (28,29), la dégradation de la MEC est contrôlée et régulée contrairement aux conditions pathologiques telle que l'IRC au cours desquelles ce mécanisme est totalement dérégulé (30).

1.2.1. Les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes

Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules complexes. Ils sont constitués d'une chaîne polypeptidique sur laquelle sont liés par des liaisons covalentes des GAGs. Ces derniers sont formés de polymères de disaccharides portant des carboxylates ou des sulfates qui s'associent avec le cœur protéique, sauf pour les hyaluronanes qui ne sont pas sulfatés ni associés à une chaîne protéique. Les PGs sont identifiés en fonction du type de GAGs qu'ils portent. Dans cette famille, on trouve les protéoglycanes à chondroïtine-sulfate (CS-PG), à héparane-sulfate (HS-PG) et à kératane-sulfates (KS-PG) (31). Les principaux GAG retrouvés dans la MEC vasculaire sont les HS-PG et les CS/HS-PG (decorine, biglycan et versican). Parmi leur rôle dans la paroi vasculaire, ces GAGs influencent la liaison des apolipoprotéines sur les *Low Density Lipoprotein* (LDL).

Les variations observées chez les GAGs et dans la chaîne polypeptidique permettent au PG d'assurer divers rôles biologiques (32,33). Les groupes carboxylates et sulfatés chargés négativement portés par les GAGs permettent de lier de nombreuses molécules d'eau par des interactions électrostatiques. Cette propriété permet aux PGs de participer à l'hydratation de la MEC (34). De plus, les PGs sont capables de fixer des cytokines ou des facteurs de croissance ce qui permet de les stocker temporairement et de réguler leur activité. Enfin, dans les vaisseaux sanguins, les PGs sont capables de se lier aux cellules vasculaires à la MEC, de contrôler la coagulation et ils servent de réservoir pour les enzymes du métabolisme lipidique (31).

1.2.2. Les glycoprotéines de structure

Dans la MEC vasculaire, les principales glycoprotéines de structure sont les fibronectines et les laminines.

La fibronectine permet l'adhérence des cellules vasculaires lors du développement des vaisseaux sanguins et se lie aux plaquettes ainsi qu'aux monocytes via les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ (35,36). Les laminines, jouent un rôle crucial dans la formation et le remodelage vasculaire à travers leurs implications dans l'élaboration de la lame basale et la régulation des cellules endothéliales. Les thrombospondines régulent les interactions cellules/protéines matricielles et les ténascines sont impliquées dans le développement embryonnaire et la réparation tissulaire. Enfin, l'ostéopontine est exprimée par les CMLs, les monocytes et les macrophages au cours de pathologie inflammatoire. Cette glycoprotéine est impliquée dans le développement dans les calcifications vasculaires également retrouvées au niveau des lésions athérosclérotiques avancées (12,25,37).

1.2.3. Les collagènes

1.2.3.1. Généralités

Les collagènes forment la famille de protéines matricielles la plus abondante dans l'organisme. Ils représentent 30% des protéines totales. Aujourd'hui, 28 collagènes ont été identifiés et numérotés de I à XXVIII. La structure principalement retrouvée au sein des collagènes est une triple hélice résultant de l'association de 3 chaînes polypeptidiques possédant une répétition de triplet Gly-X-Y où la position X est souvent occupée par une proline et Y par une hydroxyproline (38). Ces acides aminés sont responsables de la conformation en hélice gauche des 3 chaînes α qui s'assemblent spontanément afin de former la triple hélice droite. Différentes associations supramoléculaires sont alors possibles permettant de former des homotrimères et des hétérotrimère (39). Cette organisation supramoléculaire fournit une très grande stabilité thermique et la résistance mécanique des collagènes.

Les collagènes sont classés en fonction de leur domaine d'homologie structurale, de leur organisation supramoléculaire, de leurs distributions tissulaires et de leurs fonctions. On distingue donc les collagènes fibrillaires, les collagènes de feuillets, les collagènes associés aux fibres, les collagènes régulateurs de la formation des fibrilles, les collagènes à triple hélice

interrompue associés aux fibrilles (FACIT), les collagènes transmembranaires et les multiplexines. La famille des collagènes, la plus répandue, est représentée par les collagènes fibrillaires qui constitue 90% du collagène total (40). Dans la paroi vasculaire, les collagènes majeurs sont les collagènes fibrillaires I, III et V, les collagènes non fibrillaires IV et VI et les FACITS XII et XIV. Cependant les collagènes fibrillaires I et III sont les plus abondants dans la paroi vasculaire car ils représentent 60 et 30% respectivement. Ces collagènes jouent un rôle structural dans la paroi des vaisseaux sanguins (12,38).

1.2.3.2. Les collagènes fibrillaires

Cette classe de collagène, composée de 7 membres, forme les fibrilles et est responsable de la résistance du vaisseaux (41). Leur localisation varie au sein même de l'aorte. En effet, dans l'aorte ascendante, ces collagènes sont retrouvés dans la média et l'intima alors qu'au niveau de l'aorte descendante et les artères musculaires, le collagène I se trouve dans la média et le collagène III est situé dans l'adventice (42).

L'ARNm de ces collagènes est traduit en préprocollagène formé de 3 chaînes α encadrées de part et d'autre par un propeptide. Ensuite, la libération du peptide signal dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) forme le procollagène qui subit plusieurs modifications post-traductionnelles. Des liaisons hydrogènes sont créées et implique des résidus prolyl et lysyl, indispensables pour la stabilité de la structure. L'hydroxylation observée est catalysée par diverses enzymes (prolyl-3-hydroxylase, la prolyl-4-hydroxylase et les lysyl-hydroxylase). De plus, des processus de glycosylation sont observés sur des résidus d'hydroxyproline, impliquant galactosyl-transférase et glycosyl-galactosyl-transférase ce qui régule le diamètre de la fibre. L'assemblage des trois chaînes α se réalise en suivant un mécanisme dit de " fermeture éclair " de la partie globulaire C-terminale vers la partie non globulaire en N-terminale. Cette triple hélice est ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire où les propeptides sont clivés. La fibrille de collagène est alors constituée par assemblage des molécules matures de collagène parallèlement les unes aux autres. L'ensemble de la structure est maintenu par des liaisons inter- et intra-chaînes formées par certains résidus. L'enzyme responsable de cette première étape est la lysyl oxydase qui, par désamination de lysines ou hydroxylysines, forme des groupements aldéhydes hautement réactifs responsables de ces liaisons covalentes. La fibre de collagène se développe suite à l'association de fibrilles de collagène à d'autres protéines telles que les protéoglycanes (12,38,43) (Figure 5).

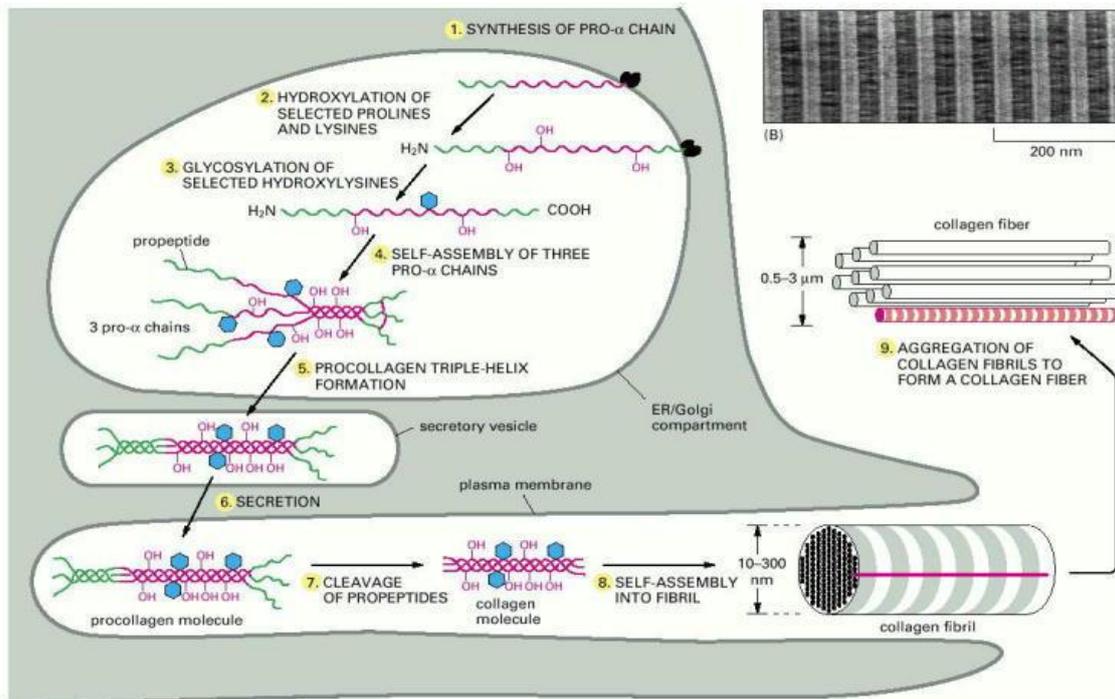


Figure 5 : Représentation schématique de la formation des fibres de collagène. Les chaînes α nouvellement synthétisées subissent des modifications post-traductionnelles dans le RER. L'assemblage de 3 chaînes α forme le procollagène qui continue sa maturation dans l'appareil de Golgi. À la suite de sa sécrétion, le procollagène donne la molécule mature de collagène après le clivage des propeptides. Ces molécules s'assemblent pour former les fibrilles de collagène qui s'assemblent à leur tour pour former la fibre de collagène. D'après Bruce et al, 2002 (43)

Dans la paroi artérielle, les collagène I et III sont localisés dans la média et l'adventice (44). Le collagène I est formé de 2 chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$ [$\alpha 1(I)$]₂ $\alpha 2(I)$ (40) alors que le collagène III est le résultat de l'assemblage de 3 chaînes [$\alpha 1(III)$]₃. Le collagène I sert de support nécessaire aux tissus et joue un rôle fondamentale dans la morphogénèse et la croissance tissulaire (44) en interaction avec le collagène III (45).

1.2.4. L'élastine

Dans les artères élastiques, la protéine matricielle la plus abondante est l'élastine puisqu'elle peut représenter 50% du poids sec de l'artère. Dans ce système vasculaire, les tissus sont soumis à de fortes contraintes qui sont absorbées par les propriétés élastique et de résilience de la paroi assurées par les fibres élastiques (46,47). Ces propriétés sont indispensables au fonctionnement physiologique des artères soumises à des cycles répétés d'extension et de retour à une structure normale. L'élastine est le composant central des fibres élastiques de la paroi

vasculaire puisqu'elle représente 90% de ses constituants, les microfibrilles constituant les 10% restants (Figure 6) (47–49).

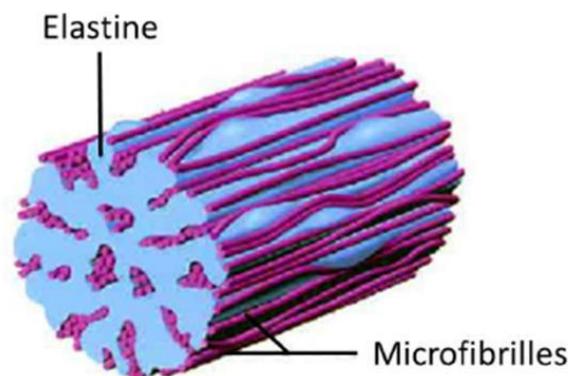


Figure 6 : Représentation schématique d'une fibre élastique. Le cœur d'élastine (bleu) entouré par le manteau de microfibrille (violet). D'après Mithieux et al, 2005 (46).

L'élastine est une protéine insoluble, hydrophobe et extrêmement réticulée (46) dont l'expression et l'organisation sont dépendantes du tissu concerné (Figure 6). Par exemple, dans l'aorte, elle se présente sous forme de lames élastiques alors que dans le cartilage elle est sous forme de nid d'abeille (Figure 7) (46). Cette protéine est synthétisée par les CMLs, les fibroblastes et les cellules endothéliales sous forme d'un précurseur soluble, la tropoélastine. Sa synthèse débute au cours de l'embryogenèse jusqu'à la période prénatale (50) puis elle est ralentie après la naissance jusqu'à la puberté, et à partir de cette phase, la synthèse est diminuée voire arrêtée chez l'adulte (51). Dans le corps humain, c'est une des protéines qui possède la plus longue demi-vie, 70 ans (46).

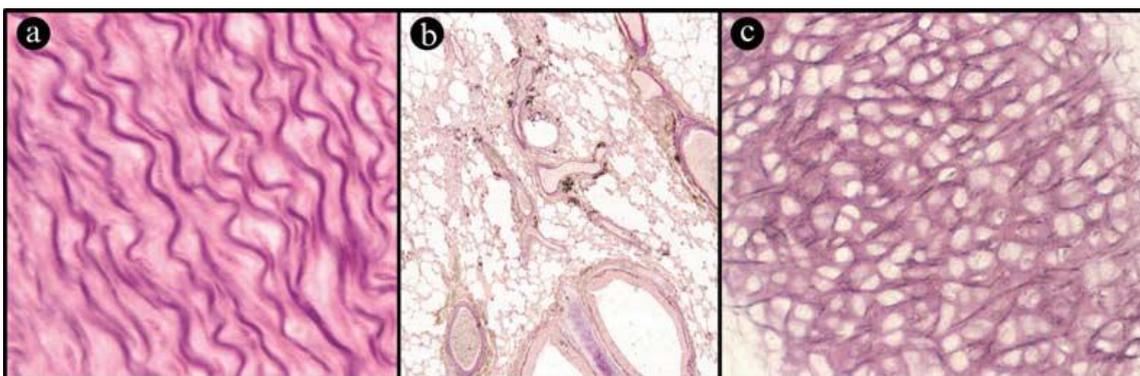


Figure 7 : Organisation des fibres élastiques selon le tissu. a : lames élastiques dans l'aorte ; b : Lattice dans le poumon ; c : Nid d'abeille dans le cartilage. D'après Mithieux et al, 2005 (46).

1.3. Les fibres élastiques : élément clef de la paroi vasculaire

Dans les vaisseaux sanguins, ces fibres élastiques sont retrouvées au sein des limitantes interne et externe mais également dans la média autour des CMLs (14). La synthèse de ces fibres élastiques suit le même schéma que la synthèse de l'élastine appelée l'élastogénèse. Ce processus regroupe l'ensemble des étapes cellulaires et extracellulaires dont la finalité est la formation de fibres élastiques fonctionnelles. Ainsi chez l'adulte, il n'a plus de formation de fibres élastiques puisque la production des acteurs impliqués dans ce processus et la cinétique de formation sont désorganisées formant une fibre non fonctionnelle. Cela explique que chaque personne possède " un capital élastine " et les dommages retrouvés sur ces fibres sont irréversibles (25,50,51).

L'élastogénèse implique une régulation intracellulaire au niveau transcriptionnel et post-traductionnel, la sécrétion extracellulaire et l'assemblage des monomères de tropoélastine au site de synthèse suivit par la maturation des fibres élastiques.

1.3.1. Organisation du gène de la tropoélastine

La tropoélastine humaine est issue de la transcription d'un gène unique, le gène ELN, localisé sur le chromosome 7 de la région 7q11.2 (52). La transcription de ce gène donne un transcrit primaire de 40 kb constitué de 34 à 36 exons en fonction des épissages alternatifs. Après traduction, ce transcrit donne naissance à un polypeptide de 60-72 kDa (12,14) à l'origine des 11 isoformes de la tropoélastine identifiés chez l'Homme (53).

Ce gène code pour des domaines hydrophobes et hydrophiles ayant des fonctions bien distinctes et retrouvées sur des exons différents. En effet, les domaines hydrophiles sont riches en lysine principalement impliqués dans la formation des liaisons croisées impliquées dans la stabilisation de la fibre élastique. Les domaines hydrophobes contiennent de nombreuses glycines, valines et prolines responsables des propriétés élastiques de l'élastine (Figure 8) (46).

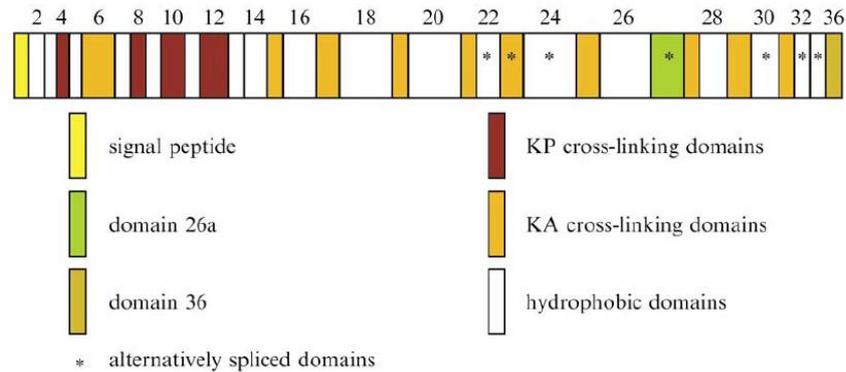


Figure 8 : Organisation des différents exons présents dans le gène de l'élastine. *Le gène de l'élastine est constitué d'une alternance d'exons codant pour des domaines hydrophobes et hydrophiles. Les domaines de liaisons sont divisés en domaines KA (lysine-alanine) et KP (lysine-proline). Les exons marqués d'une étoile sont soumis à un épissage alternatif de l'ARN pré messager. D'après Mithieux et al, 2005 (46).*

Ce gène contient au moins sept exons qui sont soumis à un épissage alternatif (exons 22, 23, 24, 26A, 30, 32 et 33) (54) (55). L'exon 24 code pour une séquence qui a été initialement décrite comme étant le site de reconnaissance de l'*Elastin Binding Protein* (EBP), essentiel dans les processus de sécrétion de la tropoélastine mais également de la signalisation qu'il induit. L'isoforme majeure de la tropoélastine ne comporte pas de séquence codée pour l'exon 26A (56). Enfin ce gène se termine par le domaine C-terminal dans lequel on trouve la séquence GRKRRK permettant la liaison aux intégrines telle que l'intégrine $\alpha\beta 3$ qui est essentielle pour l'élastogénèse (57).

L'élastogénèse se produit seulement pendant la période fœtale et néonatale impliquant certains types cellulaires (CMLs, fibroblastes, cellules endothéliales, chondroblastes, cellules mésothéliales (50)) et de façon tissu spécifique (51). Cela nécessite une régulation fine du gène de l'élastine. La région promotrice présente de nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription type SP1 ou AP-1(58). De plus, 8 sites d'initiation de transcription ont été identifiés indiquant une modulation de l'expression par des mécanismes complexes (59–61). En parallèle, des facteurs exogènes peuvent aussi réguler l'expression de la tropoélastine. Ils sont impliqués dans les mécanismes de stabilisation de l'ARNm ou dans la régulation de la synthèse (62). À titre d'exemple, le *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) inhibe la transcription du gène en modulant son activité promotrice *via* le complexe AP-1/Fos/Jun (63).

1.3.2. La formation des fibres élastiques

1.3.2.1. Synthèse et incorporation des monomères de tropoélastine

L'ARNm mature subit un épissage alternatif dans le noyau puis il est exporté dans le cytoplasme afin d'être traduit à la surface du RER formant le polypeptide 60-72 kDa (64). Dans la lumière du RER, le peptide signal est clivé et la protéine est transportée jusqu'à l'appareil de Golgi où elle subit diverses modifications post-traductionnelles comme une hydroxylation des résidus prolyls (65). Une fois la synthèse terminée, la tropoélastine est associée à une protéine chaperonne, l'EBP, une sous-unité du Complexe Récepteur de l'Élastine (CRE) fixant l'élastine. Cette association protège la tropoélastine d'une dégradation précoce et d'une auto-agrégation (66). Ce complexe s'associe à la surface de la cellule avec les deux autres sous-unités du CRE qui sont nommées *Protective Protein/Cathepsin A* (PPCA) et Neuraminidase-1 (Neu-1) formant un complexe fonctionnel. L'activité catalytique de Neu-1 désialyle les glycoprotéines des fibres élastiques (la fibuline, la fibrilline) en cours de synthèse situés au niveau des microfibrilles permettant le démasquage des galactosides. Ces résidus se lient alors à l'EBP entraînant la libération du monomère de tropoélastine. Cette tropoélastine libérée peut être incorporée au réseau de microfibrilles au niveau du site de formation de la fibre élastique (67). L'EBP libre est ensuite recyclé dans une vésicule endosomale intracellulaire permettant de nouveau une association avec un monomère de tropoélastine (Figure 9) (68).

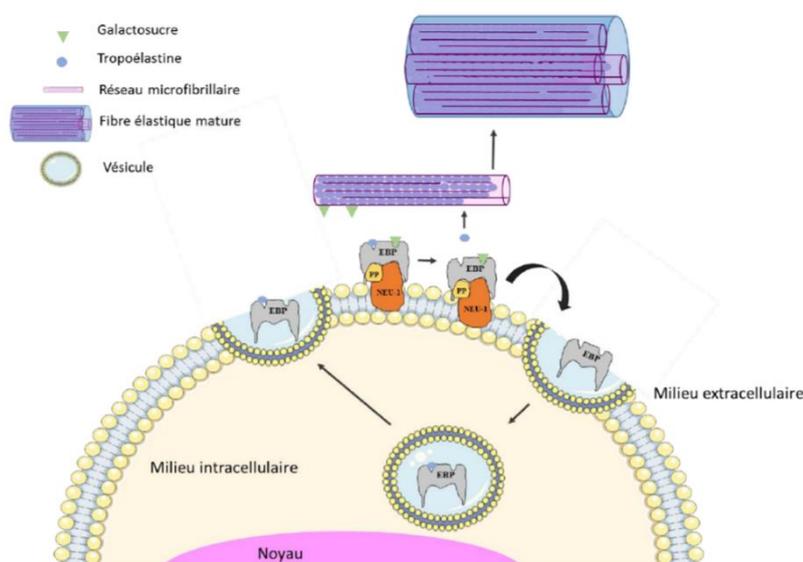


Figure 9 : Rôle du recyclage de l'EBP lors de la formation de la fibre élastique

Le dépôt de tropoélastine sur le réseau de microfibrilles lui confère une orientation adéquate pour son incorporation aux fibres élastiques en cours de synthèse. L'ensemble est stabilisé par des liaisons croisées entre la fibrilline-1 et les domaines hydrophiles de la tropoélastine (69), ainsi que par la liaison calcium-dépendante entre *Microfibril Associated GlycoProtein-1* (MAGP-1) et la tropoélastine (70). Enfin la région C-terminale joue aussi un rôle crucial dans l'ajout des monomères de tropoélastine aux fibres élastiques en cours de synthèse (71).

En plus de ceci, deux mécanismes sont essentiels à l'incorporation de la tropoélastine aux polymère d'élastine que sont la coacervation et la réticulation.

1.3.2.2. Coacervation de la tropoélastine

C'est un mécanisme moléculaire qui intervient dans l'association et l'alignement des monomères de tropoélastine facilitant la formation des liaisons croisées entre les lysines proches (46). Des résultats obtenus *in vitro* étudiant ce phénomène ont montré que les monomères de tropoélastine s'agrègent avec l'augmentation de la température grâce à des interactions entre les domaines hydrophobes. Les molécules d'eau forment des liaisons hydrogène autour des régions hydrophobes, s'organisant en une configuration ordonnée appelée " clathrate ". L'augmentation de la température déstructure cette organisation libérant les domaines hydrophobes qui peuvent interagir entre eux au niveau de diverses séquences telles que GVGVP, GGVP, GVGAP formant un coacervat (72). C'est un processus entropique, réversible, dépendant de nombreuses conditions environnementales comme la température, le pH, la force ionique et la concentration en monomères. Les conditions optimales de coacervation de la tropoélastine ont été identifiées regroupant une température de 37°C avec 150 mM de NaCl et un pH = 7,8 (73).

1.3.2.3. La formation des liaisons croisées

Les monomères de tropoélastine sont associés par des liaisons covalentes dans l'espace extracellulaire catalysées par des amine-oxydases dépendantes du cuivre, les lysyl-oxydases (LOX) (74). Cette famille d'enzyme est composée de deux sous-groupes formés de la LOX et de la LOX-like (LOXL)1 et de la LOXL2-4 respectivement. Le domaine catalytique est situé

dans la partie C-terminale alors que la partie N-terminale constitue le prodomaine pour la LOX et la LOX1. Pour le second group, la fonction de cette extrémité reste à déterminer. Il a été démontré par l'équipe de Schmelzer et *al* que la LOXL2 est impliquée dans la synthèse des liaisons croisées au sein de la tropoélastine (75). Elles sont responsables de la déamination oxydative des groupements $\text{NH}_2\text{-}\epsilon$ des lysines de la tropoélastine (76). Ceci conduit à la formation d'aldéhydes très réactifs comme l'allysine, précurseur des liaisons covalentes intra- et inter-moléculaires au sein de l'élastine. Ces liaisons résultent de la condensation spontanée non-enzymatique de résidus d'allysine à allysine ou avec d'autre résidus lysyl non modifiés (Figure 10) (77). Cette modification post-traductionnelle est cruciale aux fonctions de l'élastine et permet sa réticulation (56,78–80). Différents types de liaisons croisées peuvent alors se former telles que les liaisons bifonctionnelles (allysine-aldols et lysino-norleucine), les trifonctionnelles (méro-desmosine) ou encore les tétrafonctionnelles (desmosine et isodesmosine) spécifiques de l'élastine mature (81,82).

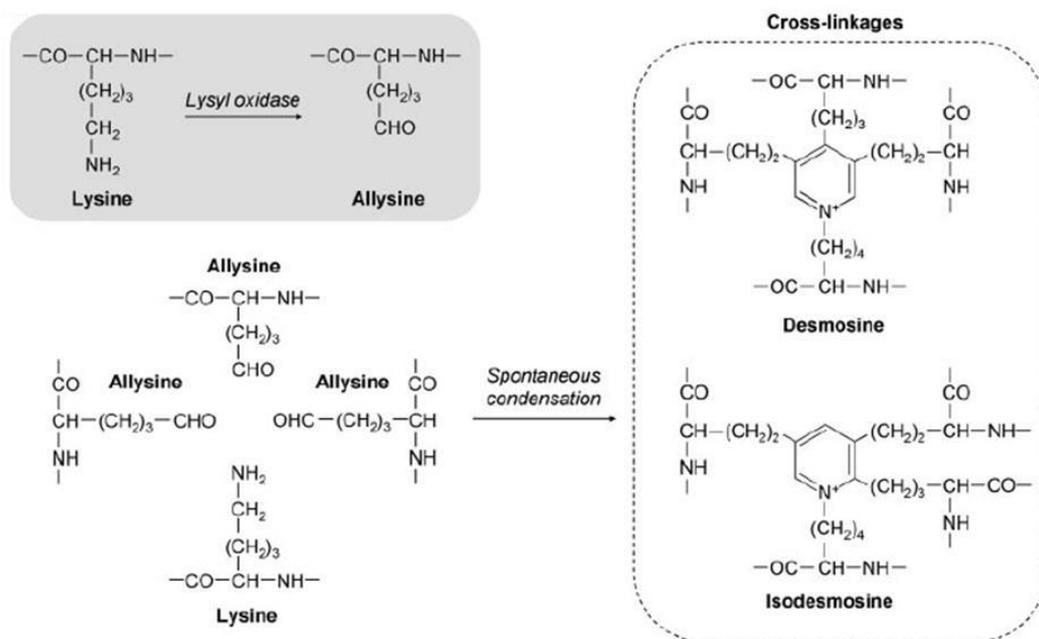


Figure 10 : Formation des liaisons croisées formées entre les monomères de tropoélastine
D'après Oitate et al, 2007 (77).

La tropoélastine humaine possède deux types de domaines riches en lysine, impliqués dans la formation des liaisons croisées (Figure 8). Le domaine KA est caractérisé par des résidus lysines regroupés par deux ou trois qui sont séparés par deux ou trois alanines formant une structure en hélice α . Cette organisation permet la formation de liaisons de type

tétrafonctionnelle. L'autre domaine nommé KP est constitué de paires de lysine séparées par une ou plusieurs proline induisant une contrainte stérique ce qui empêche la formation d'une structure en hélice (83).

Après modification par les LOX, la tropoélastine peut être incorporée aux fibres élastiques en cours de synthèse par une polymérisation covalente irréversible induisant la croissance du réseau élastique (Figure 11) (84)

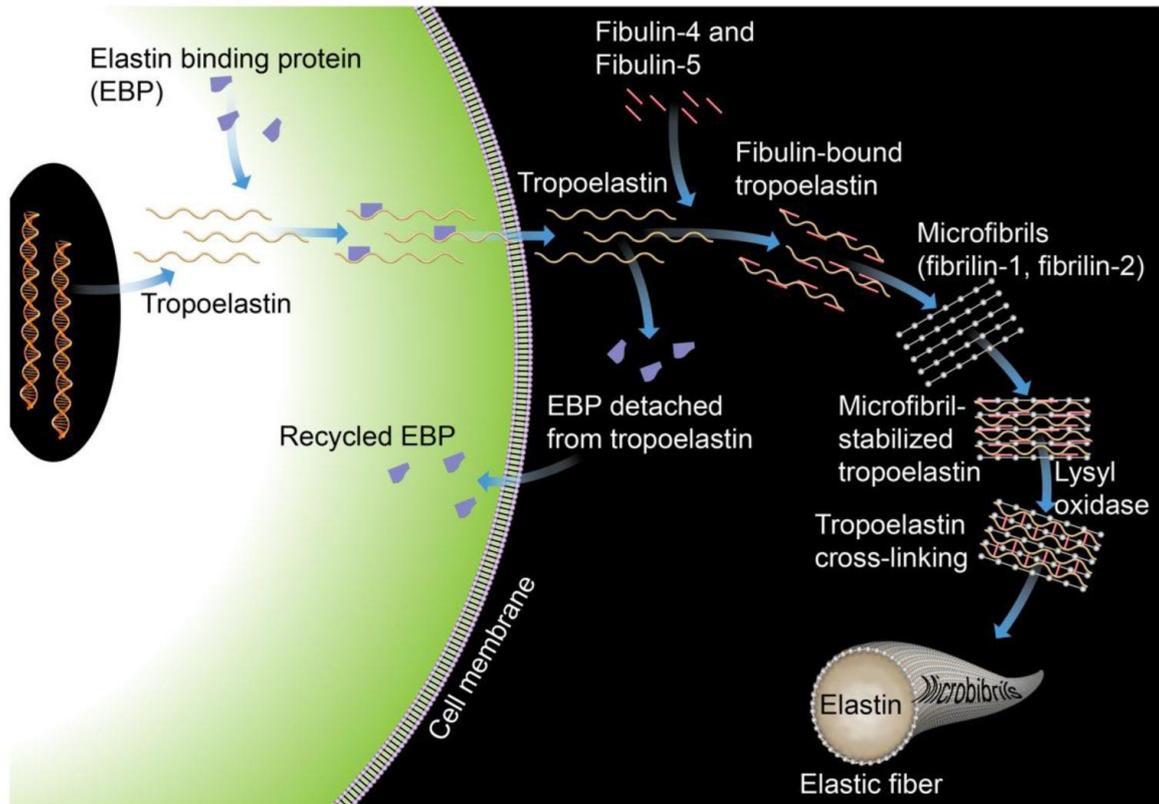


Figure 11 : Représentation schématique du processus d'élastogénèse. Après synthèse et sécrétion de la tropoélastine, la libération de cette dernière au niveau de la fibre élastique en cours de synthèse permet son intégration via les processus de coacervation et de réticulation. Ces derniers impliquent l'action enzymatique de LOX. D'après Xu et al, 2014 (85).

1.3.2.4. L'élastine mature

L'élastogénèse donne naissance à l'élastine mature, un polymère insoluble constitué de plusieurs monomères de tropoélastine liés entre eux par des liaisons croisées (82). L'élastine mature assure l'élasticité des différents tissus grâce à son hydratation. En effet, à l'état relâché, cette molécule présente une hydratation et une entropie importante contrairement à l'état contracté où ces paramètres sont faibles. Ces propriétés physicochimiques sont responsables de l'élasticité de l'élastine (56).

1.3.3. Les autres composants des fibres élastiques

Les microfibrilles sont des structures supramoléculaires composées de glycoprotéines matricielles. Elles constituent l'échafaudage nécessaire à la synthèse des fibres élastiques. En effet, les microfibrilles participent à l'alignement des monomères de tropoélastine avant la formation des liaisons croisées avec la fibre élastique catalysées par les LOX (49). De plus, ces molécules permettent la liaison des cellules aux fibres élastiques dans la MEC et sont impliquées dans la biodisponibilité de facteurs de croissance tels que le *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β). Enfin, dans les vaisseaux, ces microfibrilles sont responsables des propriétés de résilience (14,25). Au sein des fibres élastiques, les microfibrilles sont principalement formées de fibrillines qui se lient aux MAGP, les fibulines et l'émiline-1 (48).

1.3.3.1. Les microfibrilles

Les fibrillines sont des glycoprotéines de 350 kDa riche en cystéine. Elles constituent l'élément structural essentiel des microfibrilles (86). Leur structure primaire est formée de domaine *calcium-binding Epidermal Growth Factor* (cbEGF) (87). Elles possèdent également des séquences de type " Arginine, Glycine, Aspartate " (RGD) interagissant avec les intégrines (88,89) ainsi que des domaines de liaisons héparine qui se lient aux protéoglycanes du type héparane sulfate (90). Elles jouent un rôle important dans la migration, l'adhérence, la signalisation, et les interactions entre protéines. De plus, elles sont impliquées dans la liaison et la séquestration de facteurs de croissance tels que le TGF- β dans la MEC. En effet, la fibrilline-1 interagit avec les *Latent Transforming Growth Factor β Binding Proteins* (LTBPs) qui participent au complexe *Large Latency Complex* (LLC) permettant le stockage du TGF- β et empêchant sa libération dans la MEC (91,92).

Il existe trois fibrillines connues (1-2-3) intervenant dans la formation et l'organisation des fibres élastiques (48,90,93). Il a été montré que des mutations faux sens observées au sein des domaines cbEGF du gène de la fibrilline-1 sont responsables du syndrome de Marfan entraînant une perturbation du tissu conjonctif. D'un point de vue vasculaire, cette pathologie se caractérise par une dilatation aortique avec un risque élevé de dissection aortique s'accompagnant parfois d'une fuite valvulaire (94).

La fibrilline-2 sert de support pour la fibrilline-1 puisqu'elle est capable de se lier à cette dernière par sa région N-terminale (95). Une mutation de son gène est responsable d'un arachnodactylie congénitale avec contracture présentant les mêmes signes cliniques que le

syndrome de Marfan (96). La fibrilline-3 est exprimée au cours du développement embryonnaire comme la fibrilline-2 (14,97).

Les *Microfibril-Associated Glycoproteins* (MAGPs) sont des petites glycoprotéines d'environ 20 kDa. Il existe deux membres dans cette famille, MAGP-1 et MAGP-2 (14). Elles participent au maintien de l'intégrité structurale des microfibrilles (98,99).

MAGP-1 possède deux domaines différents : le domaine N-terminal acide et riche en proline comportant un résidu glutamine et un domaine C-terminal chargé positivement avec 13 résidus cystéines (49). Elle est retrouvée dans les domaines globulaires des microfibrilles et se lie aux fibrillines par un pont disulfure et des liaisons croisées (99). La liaison MAGP-1/fibrilline-1 participe au mécanisme d'assemblage des microfibrilles. De plus, MAGP-1 peut se lier à la tropoélastine permettant de stabiliser l'interaction entre les microfibrilles et l'élastine lors de la formation des fibres élastiques (100).

La MAGP-2 est localisée dans les microfibrilles associées à l'élastine dans divers tissus tels que les poumons, les ligaments, l'aorte (98). Elle est riche en sérine ainsi qu'en thréonine et contient un motif RGD pour les interactions avec les intégrines (49,98). Elle joue un rôle dans l'assemblage des microfibrilles ou des fibres élastiques (101).

Les fibulines, exprimées par les CMLs au cours du développement du système cardiovasculaire (102), sont des protéines de 50 à 200 kDa qui possèdent des domaines de type *Epidermal Growth Factor* (EGF) liant le calcium suivi d'un domaine C-terminal de type fibuline (103). Il existe 5 isoformes de fibuline (de 1 à 5) mais seulement trois (fibuline-1,-2 et -5) sont fortement impliquées dans la synthèse et l'assemblage des fibres élastiques. En effet, la fibuline-1 est localisée dans le cœur amorphe d'élastine des fibres élastiques dans les vaisseaux sanguins (104). La fibuline-2, localisée à l'interface microfibrille/fibres élastiques, est capable de se lier à la tropoélastine dans l'aorte (105) et à la fibrilline-1 (106). Enfin, la fibuline-5 interagit directement avec les fibres élastiques favorisant leur organisation en lames élastiques. Elle joue ainsi un rôle crucial dans la maturation des fibres élastiques (107). Les *Elastin Microfibril Interface Located Proteins* (EMILINs) sont des protéines à l'interface fibres élastiques/surface cellulaire et élastine/microfibrilles. Ce sont des glycoprotéines de 136 kDa exclusivement retrouvées dans les fibres élastiques de l'aorte (108,109). Il existe quatre membres dans cette famille (1 à 4) mais seule l'EMILIN-1 semble être impliquée dans la formation des fibres élastiques (110).

2. La paroi vasculaire au cours de l'IRC

2.1. Le remodelage vasculaire au cours de l'IRC : athérosclérose et calcifications vasculaires

Au cours de l'IRC, de nombreuses complications touchant les vaisseaux se développent de façon accélérée. Il a été ainsi démontré une aggravation des plaques d'athérosclérose et un développement aigu des calcifications vasculaires. L'ensemble de ces complications implique un remodelage vasculaire touchant à la fois la composante cellulaire et matricielle.

2.1.1. L'athérosclérose

2.1.1.1. Les étapes de son développement

Le développement de l'athérosclérose débute par le phénomène de dysfonctionnement endothéliale qui est retrouvé notamment au niveau des zones de perturbations du flux sanguin modifiant les forces de cisaillement au niveau des cellules endothéliales (111). Cela induit un stress oxydant associé à une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion permettant le recrutement de monocytes circulants accompagné de molécules pro-thrombotiques et pro-inflammatoires (112,113).

Les LDLs s'accumulent dans l'espace sous-endothélial suite à leur pénétration et à leur maintien par les protéoglycanes ou les GAGs de la MEC (114). Cette accumulation est associée à une oxydation progressive des LDLs induisant la formation de LDL avec différents degrés d'oxydation (LDLox). Ce processus d'oxydation implique le stress oxydant produit par les cellules de la paroi vasculaire, par les cellules inflammatoires ainsi que par l'action d'enzymes telles que la 15-lipoxygénase (115). Ces LDLox augmentent l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium telles que la *Vascular Chemoattractant Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), l'*IntraCellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) ou des molécules de surface appartenant à la famille des sélectines (L-, P-, E-). Cela permet l'adhésion et l'extravasation des monocytes à travers l'endothélium (116,117). Après adhésion, les monocytes pénètrent dans l'espace sous endothélial grâce à la présence de la *Monocyte Chemotactic Protein-1* (MCP-1). Lors de cette étape, ils se transforment en macrophage et prolifèrent sous l'influence de facteurs tels que le *Monocyte-Colony Stimulating Factor* (M-CSF) (118).

Les macrophages ont un rôle bénéfique puisqu'ils participent à l'épuration du cholestérol présent dans l'intima. En revanche, ils amplifient les mécanismes liés au

développement des plaques d'athéromes par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et par leur participation à la perméabilité endothéliale aux LDL (119). La captation des LDLox par les macrophages *via* des récepteurs scavengers n'est pas sous le contrôle d'inhibiteurs qui peuvent ainsi s'accumuler en grande quantité transformant les macrophages en cellules spumeuses. Les lipides vont s'accumuler au niveau intracellulaire dans la strie lipidique, puis se retrouver au centre de la plaque lorsque leur élimination ne sera plus suffisante pour limiter leur accumulation. Ceci forme alors le centre lipidique avec les débris cellulaires et les cristaux de cholestérol (12).

Les CMLs migrent alors de la média vers l'intima sous l'influence de divers facteurs pro-athérogènes. Dans cette tunique, elles vont proliférer dans l'espace sous-endothélial et entourer le cœur lipidique. Lors du changement phénotypique associé, les CMLs passent d'un état contractile à un état sécrétoire. Elles vont alors perdre certains marqueurs moléculaires impliqués dans les fonctions contractiles tels que la chaîne légère de myosine ou encore l' α -actine. Ces CMLs vont alors être capables de produire des protéines matricielles comme le collagène de type I (120), des protéases sous forme actives telles que la MMP-2 et la cathepsine S (CathS) (121,122) ou encore des facteurs de croissance et cytokines tels que le *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) ou l'Interféron- γ (IFN- γ) (123). De plus, elles expriment en grande quantité des récepteurs scavengers ce qui favorise la formation de cellules spumeuses en permettant la captation des LDLox (124). La migration, la prolifération des CMLs et leur production de MEC induisent un épaissement de l'intima entraînant la formation d'une chape fibreuse. Cette dernière, composée de fibres de collagène, de CMLs, de macrophages et de lymphocytes T, va progresser et réduire à long terme le diamètre du vaisseau sanguin concerné (125).

La progression de la lésion athéromateuse peut initialement ne pas modifier le diamètre du vaisseau sanguin, la paroi vasculaire pouvant s'adapter afin d'optimiser sa structure en fonction des conditions imposées par la taille de la plaque. Ainsi l'augmentation de la taille de la plaque entraîne des modifications de la média et l'adventice avec une augmentation de la surface de la limitante élastique interne ce qui permet un rétablissement de la taille de la lumière. Cependant, la croissance de la plaque continue son évolution limitant rapidement les effets bénéfiques de ce remodelage. En effet, une plaque occupant plus de 40% de la surface n'est plus compensée (126).

Les stades les plus graves de l'athérosclérose se manifestent par la formation d'un thrombus au niveau d'une plaque d'athérome instable. Celui-ci, en se formant après la rupture

de la plaque, obstrue progressivement la lumière du vaisseau. Les complications majeures sont l'accroissement de ce thrombus pouvant obstruer complètement la lumière. Elles ont pour conséquence les accidents vasculaires tels que l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral (Figure 12) (12).

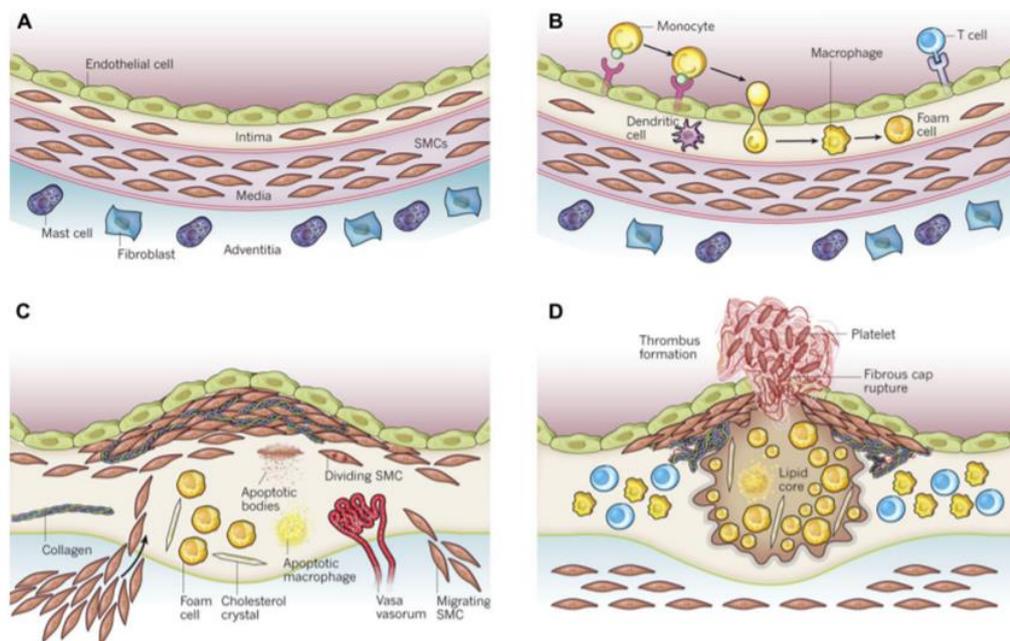


Figure 12 : Représentation schématique de la formation de la plaque d'athérome. A) : L'artère normale avec les 3 tuniques caractéristiques : intima avec les cellules endothéliales au contact direct du sang et de ses composants, la média contenant les CMLs et l'adventice contenant fibroblastes ainsi les terminaisons nerveuses et les micro-vaisseaux. B) : La première étape de l'athérosclérose comprend l'adhésion des monocytes à l'endothélium activé, leur migration dans l'intima et leur différenciation en macrophages. Après endocytose de LDLox, ces macrophages deviennent des cellules spumeuses. C) : La progression de la plaque implique la migration des CMLs vers l'intima et leur prolifération. De plus, les CMLs présentent un phénotype leur permettant de synthétiser intensément des protéines matricielles comme le collagène ou l'élastine. Le développement de cette plaque est associé à une apoptose des CMLs et des macrophages libérant les lipides dans le milieu extracellulaire formant le cœur nécrotique. D) : La thrombose est la complication ultime de l'athérosclérose qui est le résultat d'une rupture de plaque entraînant l'activation de la cascade de coagulation ce qui forme le thrombus. D'après Libby et al, 2011 (127).

2.1.1.2. Les différents types de lésions

Le développement de plaques d'athérosclérose entraîne dans certains cas la formation de plaques instables, responsables de la majorité des accidents cardiovasculaires ischémiques (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral). La classification des lésions a été proposée par l'*American Heart Association* (AHA) en se fondant sur des observations histologiques et structurales (Figure 13) :

- Lésion de type I : à ce stade, les cellules spumeuses présentes proviennent d'une transformation de macrophages après endocytose de LDLox dans leur cytoplasme, situés dans l'espace sous endothélial.
- Lésion de type II : elle est caractérisée par une accumulation de cellules spumeuses dans l'espace sous endothélial. Cela forme de petits amas qui évoluent en lésions jaunâtres parallèles au flux sanguin nommées stries lipidiques. Ce type de lésions est principalement retrouvé dans l'aorte thoracique.
- Lésion de type III : elle présente les mêmes caractéristiques que la lésion II avec, en plus, une accumulation de lipides au niveau extracellulaire sous les cellules spumeuses.
- Lésion de type IV : elle correspond au 1^{er} stade de la lésion avancée qui est caractérisée par un centre lipidique dans la paroi dû à l'accumulation progressive de lipides extracellulaires. Ce centre aussi appelé centre athéromateux est pratiquement acellulaire avec quelques macrophages ou cellules spumeuses géantes enveloppées de cristaux de cholestérol.
D'un point de vue clinique, la paroi vasculaire s'épaissit mais le diamètre du vaisseau reste inchangé.

À partir de ce stade, ce type de lésion peut évoluer vers le stade suivant de la plaque fibreuse ou directement progresser vers le stade VI en formant une plaque compliquée ou thrombotique.

- Lésion de type V : elle forme la plaque fibro-athéromateuse constituée du centre lipidique entouré d'une chape fibreuse. Le centre lipidique, présentant un aspect nécrotique, est constitué de cellules spumeuses, un peu de CMLs (20 % des cellules présentes) mais principalement de macrophages (128). De plus, des calcifications sont observées au sein de ce centre nécrotique. Concernant la chape fibreuse, elle est surtout constituée de MEC avec des collagènes fibrillaires de type I et III et des glycoprotéines. Les principaux types cellulaires retrouvés à ce niveau sont des CMLs à hauteur de 70 % qui sont responsables de la sécrétion de la MEC. Pour le reste, les macrophages et les autres cellules inflammatoires constituent l'autre partie cellulaire de la chape fibreuse. La proportion entre cellules inflammatoires et CMLs détermine la stabilité de la plaque (129).

Les signes cliniques de ce type de lésions sont la formation d'une sténose artérielle. En effet, la progression du centre nécrotique et le grossissement de la chape fibreuse réduisent le diamètre du vaisseau. Dans l'aorte, les sténoses ne sont pas suffisamment importantes pour stopper le flux sanguin contrairement aux artères de plus petite taille telles que les coronaires ou les carotides. Dans ces vaisseaux, la plaque d'athérome peut occuper un volume considérable entraînant la manifestation de signes cliniques.

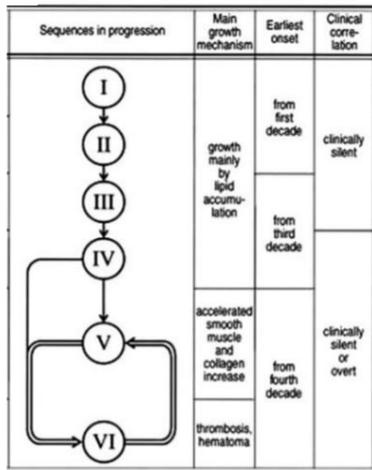
- Lésion de type VI : elle correspond à la plaque d'athérome compliquée avec la présence d'hémorragies et de thrombus intraplaque. Ce type de plaque peut cicatriser revenant ainsi à une lésion de type V mais en contrepartie la sténose continue de progresser accompagnée d'une augmentation de volume de la plaque.

Les accidents aigus tels que l'angine de poitrine ou l'infarctus du myocarde sont associés à ce type de lésion athéromateuse.

Il existe 3 sous types dans ce stade de progression de la maladie :

- VIa (ulcération) : la rupture de la plaque est la conséquence d'une perte de matière au sein du centre lipidique. Cela forme une dépression au niveau de la chape fibreuse.
- VIb (hémorragie/ hématome intraplaque) : le sang est emprisonné dans le centre lipidique.
- Vic (thrombose) : Le thrombus apparaît sous forme noirâtre au sein de l'ulcération. Les macrophages présents peuvent dégrader la fibrine et les cellules du caillot ce qui forme un thrombus fibrinocrotique. Les CMLs migrent autour du thrombus en sécrétant de la MEC ce qui le stabilise.

A)



B)

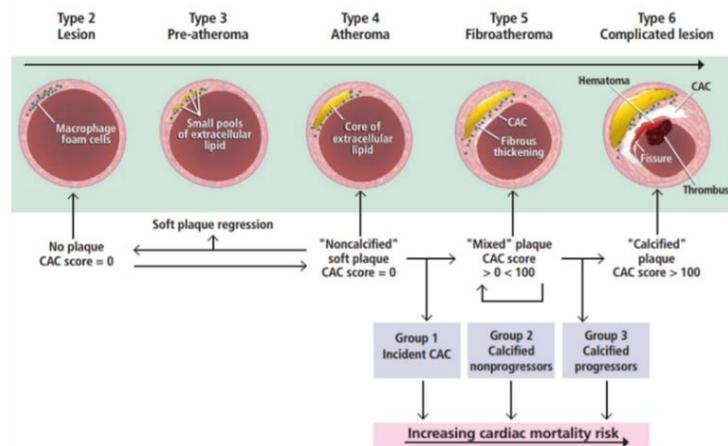


Figure 13 : Représentation schématique des différents types de lésions d’athérome.

A) : Récapitulatif des différents types de lésions avec le sens de progression associé à la période d’apparition et à la présence ou non de signes cliniques. Du type I au type IV, la progression de la plaque est favorisée par une accumulation de lipides. L’évolution de la lésion de type V au type VI est due aux dépôts thrombotiques qui s’accumulent au même endroit entraînant une occlusion progressive de la plaque. B) : Schéma des modifications physiologiques associées à chaque type de lésion en relation avec le score calcique (CAC). Adapté de Stary et al. (130) et de Parikh et al.(131)

L’athérosclérose a été identifiée comme une des principale cause de maladies cardiovasculaires chez les patients atteints d’IRC. Sa progression est accélérée par l’urémie puisqu’il été ainsi mis en évidence une corrélation négative entre la diminution du DFG et la sévérité des lésions (Figure 14) (132,133).

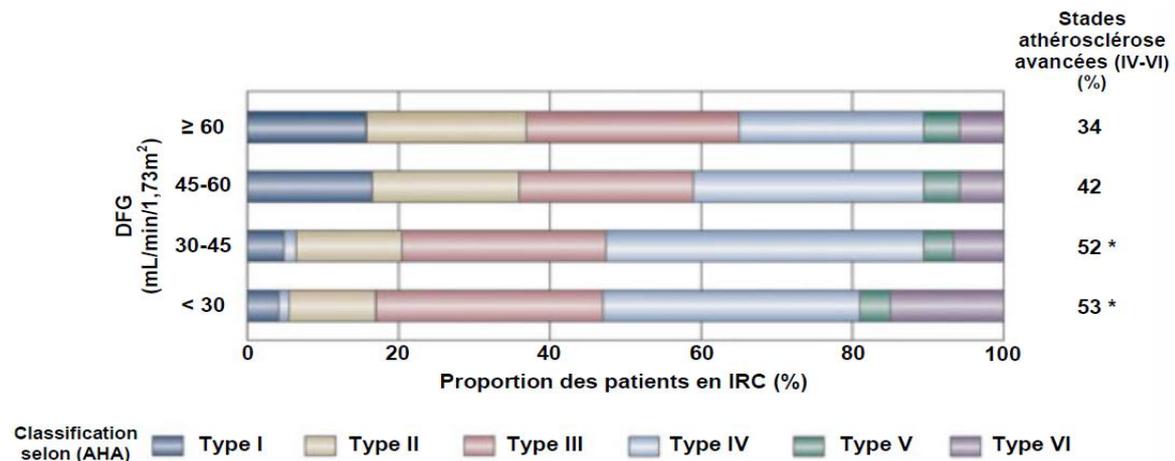


Figure 14 : Proportion des stades de l’athérosclérose en fonction de la valeur du DFG.

Le type de lésion d’athérome a été déterminé post-mortem chez des patients à différents stade d’IRC. *p < 0,05 vs DFG ≥ 60 ml/min/1,73m²

2.1.1.3. Les mécanismes de l'athérosclérose potentialisés au cours de l'IRC

Différents facteurs participant au développement des lésions athéromateuses sont exacerbés chez les patients urémiques comme l'hypertension artérielle et la dyslipidémie. En effet, l'hypertension artérielle par les contraintes de tension et le stress oxydant induisent une altération de l'endothélium ce qui favorise le développement de l'athérosclérose. De plus, l'hypertension artérielle aggrave aussi par elle-même l'IRC en augmentant la pression au niveau des capillaires glomérulaires aggravant les lésions rénales préexistantes (134). Concernant la dyslipidémie, elle est fortement athérogène et apparaît au cours de développement des lésions précoces. En effet, cette dyslipidémie est corrélée positivement à l'apparition de complications vasculaires chez les patients urémiques (135).

L'ensemble de ces facteurs entraînent des altérations de l'endothélium favorisant le dysfonctionnement endothélial, une étape primordiale dans le développement de l'athérosclérose. Au cours de l'IRC, le stress oxydant est l'un des facteurs impliqués dans la dysfonction endothéliale conduisant à la diminution de la vasodilatation de la paroi artérielle. Le stress oxydant induit une diminution de la biodisponibilité et de la production du NO par une réduction de l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS) mais aussi par une baisse de la synthèse de prostacycline et du facteur hyperpolarisant endothélial, substances à action vasodilatatrice. De plus, l'IRC induit aussi la libération, par l'endothélium, de molécules pro-thrombotiques comme le facteur de von Willebrand ou encore le facteur tissulaire (136). Une augmentation de microparticules endothéliales, provenant de la membrane plasmique après activation ou dégradation de l'endothélium, est également observée au cours de l'IRC, et participent à la formation du thrombus (137) (138). Enfin, les patients urémiques présentent une diminution du nombre de cellules progénitrices endothéliales (CPE) qui ont un faible potentiel migratoire (139). Or ce système permet de lutter contre le développement de l'athérosclérose en participant à la réparation de l'endothélium. En effet, ces CPE sont des cellules immatures qui migrent dans l'endothélium pour le réparer (138). Ainsi l'IRC diminue fortement la capacité de régénération de l'endothélium lors de dommages accélérant la mise en place des plaques d'athérome.

L'IRC est caractérisée par un état inflammatoire chronique de faible intensité (140). Chez les patients dialysés, une réponse inflammatoire aiguë est observée puisque la protéine-C réactive (CRP) et la sérum albumine A (SAA), deux marqueurs sensibles de ce processus, sont

augmentés de 46 % et 47 % respectivement. Les causes de cette inflammation sont donc imputables directement à la dialyse chez les patients en stade terminal. Cependant la rétention de molécules pro-inflammatoires due à une diminution de la fonction rénale participe aussi à cette inflammation chronique (141,142). Cet état induit donc la libération de CRP et de SAA (143,144) induisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'interleukine-6 (IL-6) et le *Tumor Necrosis Facteur-alpha* (TNF- α) (145,146). L'expression de ces molécules pro-inflammatoires est élevée au cours de l'IRC ce qui participe à une potentialisation des phénomènes observés au cours de l'athérosclérose associée.

Ainsi l'IRC accentue les processus inflammatoires et les mécanismes participant à la dysfonction endothéliale retrouvés au cours de l'athérosclérose. Cette amplification prédispose de plus le système vasculaire aux modifications de la paroi telles que l'apparition de calcifications.

2.1.2. Les calcifications vasculaires au cours de l'IRC

Avec l'athérosclérose, les calcifications vasculaires sont la cause principale de complications observées au cours de l'IRC. Elles sont caractérisées par un dépôt anormal et pathologique de phosphate de calcium dans les tissus vasculaires. Ce phénomène a longtemps été considéré comme un dépôt passif de calcium et de phosphate dans les artères et les valves cardiaques. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence que les calcifications vasculaires font intervenir des processus cellulaires hautement régulés proches de ceux retrouvés au cours de la formation osseuse(147,148).

En fonction de leur site de développement, quatre familles de calcification ont été identifiées. En effet, on distingue les calcifications intimes de l'athérosclérose, les calcifications de la média (Sclérose de Mönckeberg) principalement retrouvées au cours de l'IRC et du diabète protéinurie,, les calcifications au niveau des valves cardiaques et enfin les artériopathies urémiques calcifiantes (149).

Les calcifications intimes se forment après la mise en place de la strie lipidique (130) et de petits agrégats cristallins de calcium peuvent être détectés dans les lésions avancées

(150). L'hydroxyapatite constitue le principal minéral dans les lésions calcifiées qui se forme initialement dans des vésicules membranaires de chondrocytes et d'ostéoblastes (151).

Les calcifications Mönckeberg, situées dans la média des vaisseaux sanguins, sont associées à une augmentation des risques cardiovasculaires. Elles se développent indépendamment des calcifications athérosclérotiques avec un mécanisme proche de celui de la formation osseuse (152).

Les calcifications des valves cardiaques se développent suite à un mécanisme cellulaire activement régulé incluant le dépôt de lipoprotéines (153), une inflammation chronique (154) et une calcification active (155).

Les artériopathies urémiques calcifiantes représentent un type sévère de calcifications médiales se développant dans les vaisseaux sanguins de patients urémiques à un stade 5 (156). Elles sont retrouvées dans les artérioles de la peau et dans les artères subcutanées induisant une prolifération intimale, une fibrose et une thrombose (157)

Il a été observé que 40 % des patients urémiques présentent des calcifications comparé à des patients avec une fonction rénale normale (158). Ces calcifications vasculaires sont impliquées dans le développement des complications cardiovasculaires observées au cours de l'IRC augmentant la mortalité et morbidité associées à ces événements (159,160) .

L'événement cellulaire primordial dans le développement des calcifications vasculaires au cours de l'IRC est la transdifférenciation des CMLs présentant un phénotype *osteoblast like*. Ce changement phénotypique est caractérisé par une diminution des marqueurs spécifiques des cellules musculaires tels que *αSmooth Muscle Actin* (α SMA) et *Smooth Muscle 22 alpha* (SM22 α). En parallèle, les CMLs expriment des gènes ostéoblastiques incluant *Runt-related transcription factor 2* (RunX2) et ostéopontine. RunX2 a été identifié comme le facteur de transcription clef dans ce phénomène d'ostéodifférenciation et l'utilisation de sérums de patients urémiques stimule directement son expression induisant la ostéodifférenciation des CMLs (161). Les CMLs différenciées perdent alors leur phénotype contractile pour un phénotype synthétique leur permettant de sécréter du collagène de type I. Elles sont aussi capables de produire des vésicules matricielles riches en phosphate et en calcium qui, une fois libérées dans l'espace extracellulaire, forment des sites d'initiation de la calcification. L'IRC est caractérisée par un déséquilibre minéral favorisant le développement d'une hyperphosphatémie. Ce taux anormalement élevé de phosphate a été identifié comme le principal facteur associé au développement des calcifications vasculaires chez les patients

urémiques (162). Des études *in vitro* ont démontré que l'expression des marqueurs d'ostéodifférenciation comme l'ostéocalcine ou RunX2 est fortement induite par une concentration élevée de phosphate (163). En parallèle, l'expression de SM22 et d' α SMA, marqueurs de cellules musculaires est diminuée drastiquement lorsqu'on traite des CMLs avec du phosphate inorganique (164). Le transport du phosphate dans les cellules est médié par des cotransporteurs phosphate dépendant du sodium. Il existe 3 familles classées (type I, II et III) en fonction de leur structure, de leur distribution tissulaire et leurs caractéristiques biochimiques (165). Les types III avec Pit-1 et Pit-2 sont exprimés dans les reins, le cerveau, le cœur, les poumons, le foie, les ostéoblastes et les CMLs (166). Cependant, seul Pit-1 est surexprimé chez des rats urémiques au niveau des CMLs aortiques (167). En effet, ce transporteur participe à la différenciation ostéoblastique des CMLs en condition hyperphosphatémique par stimulation directe l'expression de RunX2 (168,169). Après induction de sa transcription par le phosphate, RunX2 induit l'activation d'un autre facteur de transcription nécessaire pour le changement phénotypique en ostéoblaste qui est ostérix. En effet, il a été démontré que RunX2 se fixe et active le promoteur d'ostérix permettant d'activer sa transcription (170). Cela active l'expression de l'ensemble des gènes nécessaires au CMLs pour devenir des ostéoblastes capables de calcifier la MEC de la paroi vasculaire (Figure 15).

Ces calcifications vasculaires peuvent de plus se développer grâce à un déséquilibre entre inducteurs et inhibiteurs. En effet, il existe des inhibiteurs endogènes afin d'éviter le développement ectopique des calcifications dans les artères. Les principaux inhibiteurs identifiés sont la Fétuine-A, *Matrix-Gla-Protein* (MGP), le pyrophosphate, l'ostéoprotégérine (171).

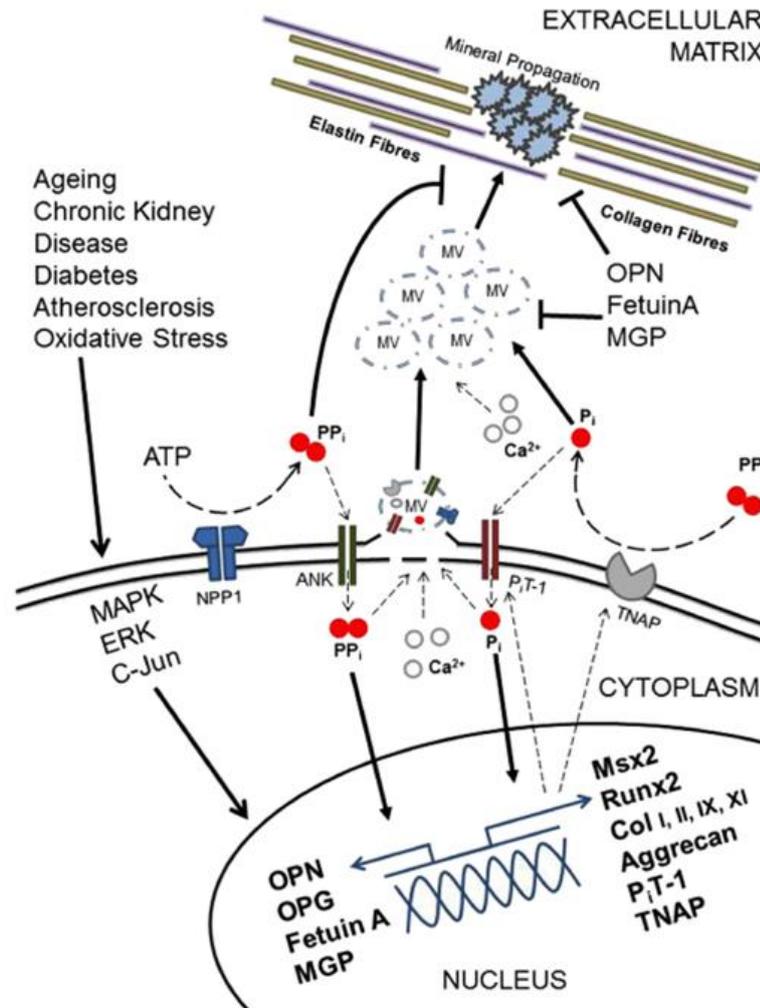


Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme impliqué dans le développement des calcifications vasculaires

D'après Zhu et al, 2012 (149)

Tout comme pour l'athérosclérose, l'IRC accélère les processus impliqués dans les calcifications vasculaire (172). Il a de plus été constaté une augmentation sérique de divers élastases comme la MMP-2 à partir de 8 semaines d'urémie puis de la MMP-9 et la cathepsine S (CathS) à partir de 12 semaines d'urémie. En parallèle, il a également été observé une déstructuration suivie d'une dégradation complète des fibres élastiques associée à une augmentation de dépôt calcique principalement au niveau des zones de cassures (173). Cette dégradation progressive des fibres élastiques conduit alors à la libération de peptides dérivés de l'élastine (*Elastin Derived Peptides*, EDPs) des dosages sérique de patients urémiques ont montré jusqu'à 110 mg/L d'EDPs chez les patients urémiques comparés à environ 50 mg/L chez les personnes en bonne santé au même âge (174). De manière intéressante, l'utilisation de souris urémiques présentant une diminution d'expression ou d'activité de la CathS, montre une

élastolyse moins importante comparée aux souris contrôles (30,175). L'ensemble de ces données semble démontrer que l'élastolyse est un processus crucial dans les complications vasculaires au cours de l'IRC. Cependant, ces résultats sont seulement de nature corrélatifs et la capacité de la CathS à générer des EDPs bioactifs n'a pas été clairement étudiée.

2.2. L'élastolyse et les produits associés : acteurs clefs dans le remodelage vasculaire

2.2.1. Les différentes élastases

La nature hydrophobe de l'élastine et la présence de nombreuses liaisons croisées sont responsables de sa résistance physico-chimique, mécanique et enzymatique (176). Cependant l'élastine peut être la cible de nombreuses élastases libérées au cours du vieillissement (177) ou de l'IRC (30).

Les protéases sont classées en fonction de leur mécanismes catalytique et des protéases à sérine, cathepsines à cystéine et MMPs peuvent dégrader l'élastine insoluble au sein des fibres élastiques (178).

Les protéases à sérine utilisent la sérine comme acide aminé du site actif pour l'hydrolyse de la liaison peptidique. Dans cette famille, les élastases les plus étudiées ont été la neutrophile élastase, la cathepsine G et la protéinase 3 appartenant à la superfamille des chymotrypsines. Le site de clivage spécifique présente dans l'élastine est caractérisé par la séquence en acides aminés suivante : Ala-Gly-Val (179). Une étude a révélé que les neutrophiles élastases ne sont pas capables de dégrader de l'élastine intacte, contrairement à la cathepsine G, mais agissent à la suite d'autres élastases plus puissantes. Toutes les élastases n'ont donc pas le même potentiel de dégradation (180).

Les cathepsines à cystéine présentent une cystéine dans leur site catalytique. Les principales élastases sont les cathepsines S, K, L et V. Des études sur leur mode de fonctionnement ont révélé l'existence de 2 étapes lors de la protéolyse de l'élastine insoluble (178,179). En effet, l'enzyme s'adsorbe à la surface de l'élastine sans engendrer d'activité catalytique. Après un réarrangement moléculaire, un complexe catalytique se forme dégradant

la fibre élastique sur laquelle cette protéase s'est fixée (181). Il existe dans l'organisme des inhibiteurs endogènes tels que la cystatine C (182).

Les MMPs nécessitent un métal, le plus souvent du zinc, pour leur activité catalytique. Parmi les 25 membres identifiés, seuls 5 dégradent l'élastine. La MMP-7 est faiblement exprimée par les cellules vasculaires, contrairement à la MMP-3 qui est aussi sécrétée par les macrophages tout comme la MMP-12. De plus, il a également été identifié que les MMP-2 et MMP-9 sont libérées par les cellules inflammatoires (13,178). Elles sont capables de dégrader la tropoélastine majoritairement sur les parties N et C-terminales puisque seuls quelques sites de clivage ont été mis en évidence dans les domaines centraux (183). Toutes ces élastases agissent également sur l'élastine insoluble mais de façon moins efficace que l'élastase des neutrophiles, et semblent donc être de faibles élastases (184–186).

2.2.2. Les produits issus de l'élastolyse: les EDPs

Les élastases précitées peuvent ainsi être responsables d'une dégradation importante du réseau d'élastine avec une libération d'EDPs (25). Certains peuvent présenter des activités biologiques les classant dans la famille des matrikines, fragments matriciels dotés d'effets biologiques régulant le phénotype des cellules cibles (187). Les EDPs répondant à cette définition sont également nommés des élastokines (47).

Les EDPs peuvent de plus être obtenus par dégradation chimique d'élastine insoluble. Cette dernière peut être réalisée soit par l'action d'acide oxalique produisant de l' α -élastine (188), un mélange de peptides, de masse moléculaire moyenne de 25 kDa, soit par l'utilisation de potasse éthanolique, conduisant à un ensemble de peptides de masse moléculaire moyenne de 70 kDa et nommé κ -élastine (189).

L'utilisation d'EDPs provenant de l'hydrolyse enzymatique ou chimique a montré que certains de ces peptides jouent un rôle dans les modifications phénotypiques cellulaires. Ces peptides possèdent majoritairement dans leur séquence un motif consensus, le motif GxxPG, qui adopte une structure en coude β de type VIII (190) (Figure 16). La séquence VGVAPG, retrouvée 6 fois dans l'exon 24 de la tropoélastine humaine, est le motif qui a été le plus étudié (47,191,192). Des EDPs avec des séquences plus longues, GPGVGAGVP ou GLGVGAGVP se sont également révélés bioactifs, stimulant la migration de CMLs aortiques (193). Des études plus

récentes ont identifié d'autres EDPs bioactifs suite à l'action de divers élastases telle que la cathepsine G (194) ou encore la MMP-9 (183).

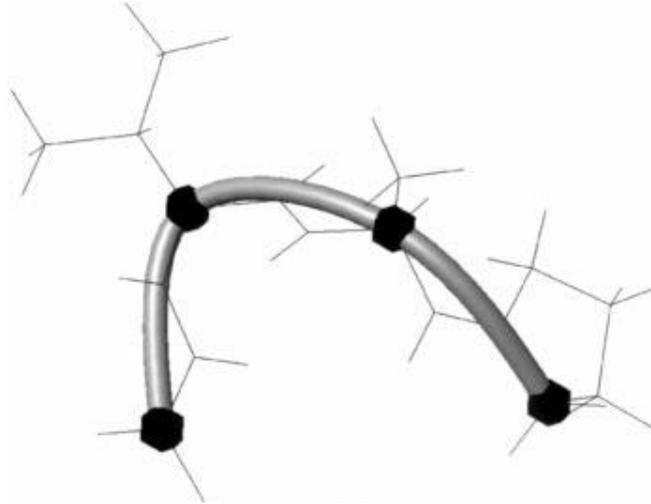


Figure 16 : Conformation du coude β de type VIII retrouvé au sein des EDPs bioactifs
D'après Brassart et al, 2001 (195)

2.2.3. Les récepteurs des EDPs

Divers récepteurs aux EDPs bioactifs ont été identifiés. Ces peptides peuvent par exemple se fixer à des intégrines telles que $\alpha V\beta_3$ ou $\alpha V\beta_5$, mais aussi à la galectine-3. Cependant ils ont été beaucoup moins étudiés et caractérisés que le CRE dont la signalisation intracellulaire et le mécanisme de fonctionnement ont été clairement identifiés. De plus, la très grande majorité des effets des EDPs sont imputables à leur fixation sur le CRE, et dans les pathologies vasculaires, seul ce récepteur semble être impliqué.

2.2.3.1. La galectine-3 et les intégrines $\alpha V\beta_3$ et $\alpha V\beta_5$

La galectine-3 humaine est une protéine de 35 kDa située à la membrane des cellules normales et tumorales. La fixation des peptides VGVAPG et VAPG sur la galectine-3 augmente l'invasion du mélanome et la dégradation de l'élastine par les MMP-2 et MMP-3, libérant davantage d'EDPs. De plus, cette interaction est impliquée dans le potentiel angiogénique en augmentant l'expression du *Vascular Endothelial Growth Factor-C* (VEGF-C). La fixation d'EDPs sur la galectine-3 régule également l'interaction cellule/MEC au cours de la

progression tumorale mammaire en favorisant l'adhésion des cellules cancéreuses sur l'élastine (196).

Les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ sont des récepteurs hétérodimérique présents à la surface cellulaire modulant divers fonctions. Elles sont capables de reconnaître des protéines de la MEC, dépendant ou non de la présence du motif RGD. L'intégrine $\alpha V\beta 3$ fixe la tropoélastine au niveau de son domaine C-terminale par la séquence GRKRRK (197). Cette liaison est essentielle dans l'élastogénèse (198). Concernant l'intégrine $\alpha V\beta 5$, la liaison s'effectue au niveau des domaines 17 et 18 de la tropoélastine favorisant l'adhésion et l'étalement cellulaire (199,200).

2.2.3.2. Le Complexe Récepteur de l'Élastine (CRE)

Le CRE, exprimé à la surface de nombreux types cellulaires, provient du complexe lysosomal de la β -galactosidase acide (201). C'est un hétérotrimère constitué de la sous-unité extracellulaire de 67 kDa qui lie les peptides d'élastine nommée " *Elastin Binding Protein* " (EBP), une protéine charnière de 55 kDa la " *Protective Protein/Cathepsin A* " (PPCA) qui maintient l'intégrité structurale du CRE et la sous-unité Neuraminidase-1 (Neu-1) de 61 kDa qui permet la transduction du signal (Figure 17) (202,203).

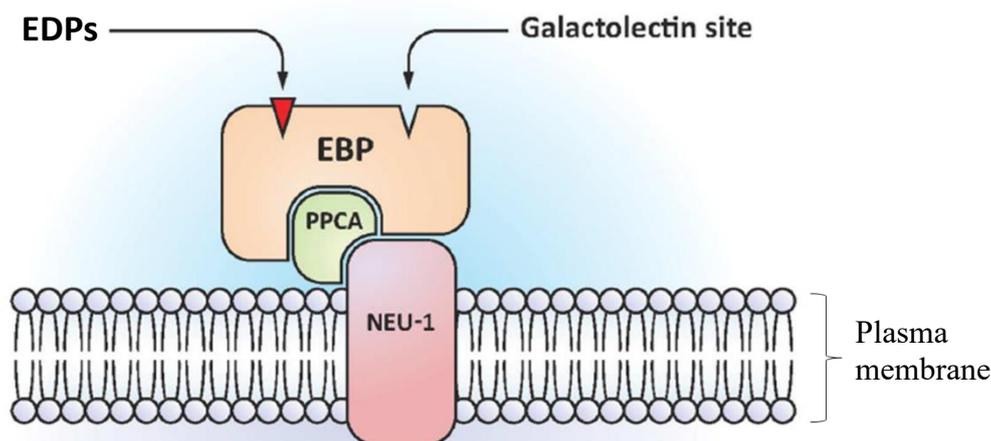


Figure 17 : Représentation schématique du Complexe Récepteur de l'Élastine
Modifié d'après Scandolera et al, 2016 (203).

2.2.3.2.1. La sous-unité de liaison des EDPs : l'Elastin Binding Protein (EBP)

L'EBP est une protéine périphérique qui fixe les EDPs et la tropoélastine avec une affinité très forte de l'ordre du nM . C'est un variant d'épissage alternatif de la β -galactosidase ayant subi deux délétions. La première implique les exons 3 et 4 avec un décalage du cadre de lecture dans l'exon 5. La seconde délétion concerne l'exon 6 et est associée au rétablissement du cadre de lecture original. Ce processus est responsable de la spécificité de la séquence de l'exon 5 pour l'EBP. Ce variant d'épissage ne possède plus d'activité enzymatique (204). La séquence de 32 résidus de l'EBP, LPGSCGQVVGSPSAQDEASPLSEWRASYNSAG, appelée V32, contenant le site de liaison pour la tropoélastine et pour les EDPs (205). Au sein de cette séquence se trouve une séquence de 14 acides aminés VVGSPSAQDEASPL (V14) qui semble directement être impliqué dans la liaison à l'EBP (Figure 18) (206).

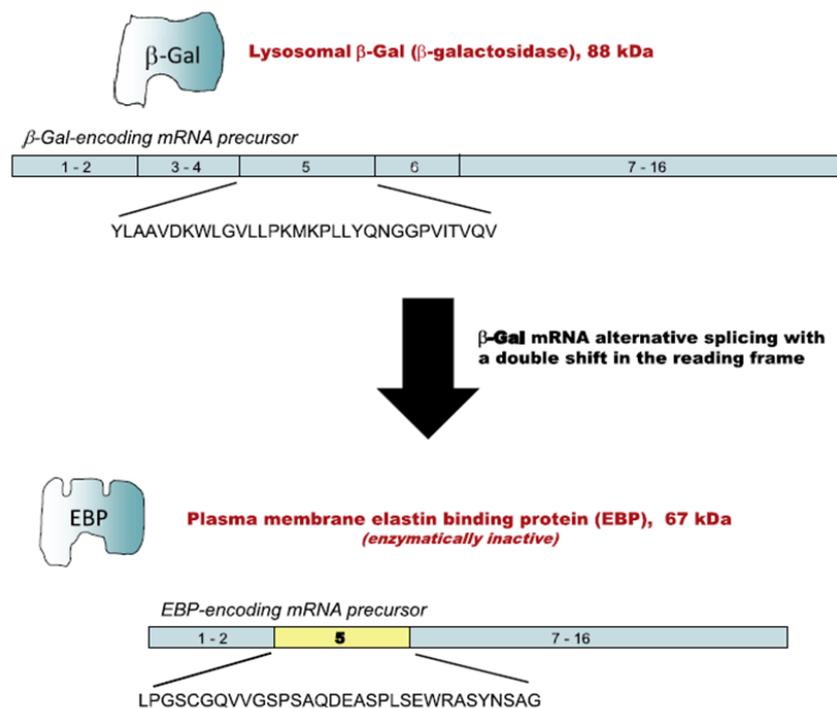


Figure 18 : Représentation schématique de l'obtention de l'EBP à partir de l'ARNm de la β -galactosidase. L'ARNm de l'EBP est obtenu après un épissage alternatif de l'ARNm de la β -galactosidase entraînant deux délétions associées à un décalage du cadre de lecture. Ce processus génère une séquence de 32 résidus spécifique de l'EBP dans laquelle se trouve le site de fixation des EDPs. Modifié d'après Maurice et al, 2013 (206).

Dans cette séquence, 2 sites de fixations se distinguent, l'un spécifique de l'EBP permettant la fixation de la tropoélastine et des EDPs, la séquence V32 précitée. L'autre site correspond à une séquence conservée de la β -galactosidase lysosomale (201). C'est un site galactosidase qui

se lie à des galactosides entraînant une diminution de l'affinité de l'EBP pour les EDPs ce qui provoque leur libération et la dissociation du CRE (68). Ainsi une interaction entre ce site de liaison avec des galactosides du réseau microfibrillaire libère la tropoélastine à la surface cellulaire lors de l'élastogénèse (48).

2.2.3.2.2. La sous-unité associée à la membrane plasmique: la *Protective Protein Cathepsin A* (PPCA)

PPCA est une protéine synthétisée sous forme zymogène de 54 kDa qui est clivée dans le lysosome en deux sous-unités de 32 kDa et 20 kDa maintenues ensemble par un pont disulfure (207,208). Elle est retrouvée au sein du complexe de la β -galactosidase dans lequel elle permet l'association et la stabilisation des sous-unités dans le lysosome et protège cet ensemble de la dégradation intra-lysosomale (209). Cette protéine est également présente dans le CRE mais au sein de ce complexe elle semble être simplement une protéine charnière qui maintient les 2 autres sous-unités en les protégeant d'une potentielle dégradation (210). En effet, le blocage de son activité sérine protéasique par l'utilisation d'inhibiteurs tels que le fluorure de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), n'inhibe pas la transduction du signal suite à une stimulation par la κ -élastine. (202). Elle n'est donc pas impliquée dans la transduction du signal après fixation d'EDPs sur l'EBP.

2.2.3.2.3. La sous-unité catalytique : la neuraminidase-1 (Neu-1)

La neuraminidase-1 (Neu-1) appartient à la famille des neuraminidases composées de 3 autres membres chez les mammifères : Neu-2, Neu-3 et Neu-4 où chacune présente une spécificité de substrat et de localisation cellulaire. Neu-1 se trouve dans le compartiment lysosomal/endosomal bien qu'un pool puisse se retrouver à la membrane alors que Neu-2 est cytosolique, Neu-3 est membranaire et Neu-4 peut être localisée dans le RER, dans les lysosomes ou encore dans les mitochondries (211). Leur activité enzymatique consiste à cliver les résidus d'acide sialique liés à une chaîne saccharidique retrouvée chez les glycoprotéines, les gangliosides et les glycolipides (212).

Chez les vertébrés, la Neu-1 est présente dans la majorité des tissus et des cellules. Sa synthèse débute par une libération d'une forme pré-proenzyme de 45,5 kDa qui après plusieurs glycosylations forme la protéine mature de 48,3 à 61 kDa (212). Dans les lysosomes, elle est

retrouvée sous forme d'un complexe multienzymatique avec deux autres hydrolases, β Gal et PPCA participant à la dégradation intra-lysosomale (213). Si la Tyr⁴¹² de son domaine C-terminal est phosphorylée, Neu-1 est adressée à la membrane où elle participe à la formation du CRE. Dans ce complexe, elle participe activement à la transduction du signal intracellulaire induit par les EDPs. En effet, l'utilisation de mutant présentant une Neu-1 inactive conduit à une diminution importante de l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 induite par les EDPs (202). De plus, Neu-1 est impliquée dans l'assemblage des fibres élastiques dans le milieu extracellulaire. En effet, des souris déficientes en Neu-1 avec une PPCA normale présentent de nombreuses anomalies dont une désorganisation des fibres élastiques avec des lamelles élastiques amincies au niveau de l'aorte (214). Enfin de nombreuses études ont démontré que Neu-1 peut interagir avec un grand nombre de récepteurs. Nous avons dans ce cadre démontré que Neu-1 interagit avec la sous-unité β du récepteur de l'insuline modulant la régulation des effets biologiques de cette hormone (215). De plus, une interaction avec un récepteur *scavenger*, le CD36, a également été mise en évidence par notre équipe. Neu-1 est, en effet, capable de moduler le taux de sialylation du CD36 ce qui régule l'accumulation des LDL oxydés par les macrophages, un mécanisme impliqué dans la progression de l'athérosclérose (216).

2.2.4. Les voies de signalisation intracellulaires du Complexe Récepteur de l'élastine

En absence de stimulation, l'EBP est dissociée du complexe PPCA/Neu-1 qui est localisé à la membrane (217). La liaison des EDPs sur la sous-unité EBP entraîne l'association des trois sous-unités pour former un complexe fonctionnel capable d'activer des voies de signalisation dépendantes du type cellulaire concerné (205,218,219). Après cette stimulation par les EDPs, Neu-1 catalyse la désialylation des gangliosides notamment le GM₃ présent au sein des radeaux lipidiques. Cela entraîne la libération de lactosylcéramide (LacCer) qui joue le rôle de second messager intracellulaire capable d'activer différents relais moléculaires et voies de signalisation (202,220). Il a de plus été montré que le traitement de fibroblastes avec du LacCer reproduit les mêmes effets que la stimulation avec des EDPs (220). La fixation de lactose sur le site β -galactoelectine de l'EBP entraîne une diminution de son affinité pour les EDPs et une dissociation du CRE (201). Ainsi le lactose est capable d'inhiber les effets induits par les EDPs après leur fixation sur le CRE.

Les voies de signalisation intracellulaires activées par les EDPs fixés sur le CRE sont variables en fonction du type cellulaire concerné. Notre équipe a mis en évidence l'implication de la voie MEK1/2 et ERK1/2 dans une cascade de signalisation faisant appel à PKA et PI3Kγ après stimulation de fibroblaste par des EDPs (221). D'autres résultats ont complétés ces études et montré que les EDPs sont capable d'induire l'activation de divers modules signalétiques tels que Ras-Raf-1-MAPK-ERK1/2, Gi-p110γ-Raf-1-MAPK-ERK1/2, AMPc-B-Raf-ERK1/2, ou Gi-p110γ-Akt (180,218,221,222). Enfin, une voie de signalisation a été mis en évidence après stimulation par des EDPs de CMLs aortiques. La fixation des EDPs sur le CRE cible l'activation de protéines Gi ouvrant des canaux calciques et l'activation séquentielle de tyrosines kinases comme FAK, " c-sarcome " (c-Src) et la cascade de phosphorylation Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2. En conséquence, une augmentation de la prolifération des CMLs fût observée après ce traitement avec des EDPs (205).

L'ensemble des voies de signalisation pouvant être activées après fixation des EDPs sur le CRE sont identifiées sur le schéma dans la figure 19 (206).

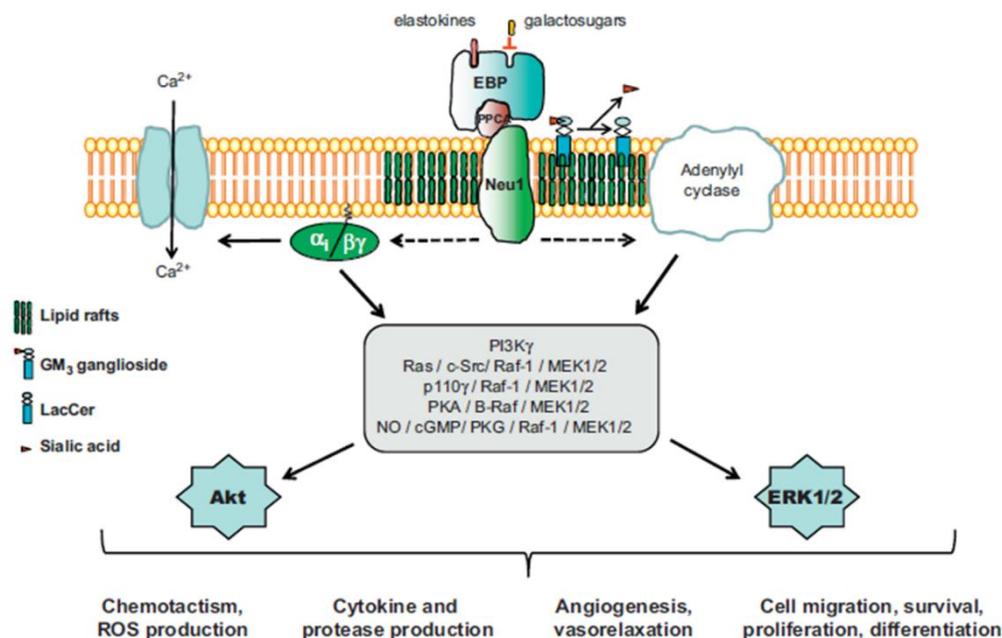


Figure 19 : Représentation schématique des différentes voies de signalisations induites lors de l'activation du CRE par les EDPs .

D'après Maurice et al, 2013 (206)

2.2.5. Rôles biologiques des peptides l'élastine au cours des pathologies vasculaires associées à l'IRC

De nombreuses équipes ont étudié les modifications des fibres élastiques au cours de diverses pathologies vasculaires. Les résultats ont démontré qu'une dégradation accrue de fibres élastiques accompagnée d'une augmentation de la libération d'EDPs sont observées lors du développement de certaines maladies cardiovasculaires. Ces effets sont notamment attribués à la libération d'élastases au cours de ces pathologies. À titre d'exemple, au cours de l'athérosclérose, il a été observé une libération de MMP-9, cathepsine S (CathS) et de cathepsine K (27,223).

2.2.5.1. Athérosclérose

La composante inflammatoire est cruciale dans cette pathologie puisque les cellules inflammatoires comme les macrophages peuvent endocyter des LDL oxydés et devenir des cellules spumeuses à l'origine d'une réaction inflammatoire chronique par une libération de cytokines pro-inflammatoires. De manière intéressante, il a été identifié de nombreux effets des EDPs sur les cellules inflammatoires. Ils stimulent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) favorisant l'oxydation des LDLs par les neutrophiles et les monocytes (224). De plus, les EDPs participent à la formation de cellules spumeuses en augmentant l'absorption de LDL oxydés par les macrophages (216). Enfin, il fût montré que les EDPs induisent la production d'IL-2 et d'IFN- γ en favorisant la différenciation de lymphocytes T en un phénotype pro-inflammatoire (225). Cette différenciation s'accompagne d'une augmentation de la libération d'élastases comme la MMP-9 (226).

Au cours de cette pathologie, les CMLs participent aux étapes précoces puisqu'elles sont à l'origine de la chape fibreuse. De plus, elles sont impliquées dans les complications vasculaires associées à l'athérosclérose telles que les calcifications. Les EDPs ont montré des effets pro-migratoires (227) et pro-prolifératifs (205) sur ce type cellulaire et l'utilisation d' α -élastine a suggéré un rôle dans la différenciation ostéogénique des CMLs. (228).

Le remodelage matriciel associé à l'athérosclérose a été observé au cours d'études réalisées chez des patients présentant des plaques d'athérosclérose. Une corrélation a alors été établie entre l'augmentation de la concentration d'EDPs et l'élastolyse retrouvée au sein de la plaque (229,230). De plus, l'utilisation de souris déficientes pour certaines élastases telles que

la MMP-9 (231) ou la CathS (232) a mis en évidence une diminution de la dégradation des fibres élastiques corrélées avec une diminution de la progression des lésions vasculaires dans un modèle pro-athérogène.

Enfin, notre équipe a mis en évidence l'implication *in vivo* des EDPs et du CRE dans la progression de l'athérosclérose. L'utilisation de deux modèles murins pro-athérogènes traités avec de la κ -élastine, a montré une augmentation significative de la taille des lésions. D'un point de vue signalétique, les résultats ont montré que ces EDPs activent PI3K γ . De plus, notre équipe a mis en évidence que l'activation de cette voie participe à la libération de ROS et à la migration des monocytes. Enfin, l'implication de Neu-1 a été démontré dans un modèle de production endogène d'EDPs par l'utilisation de souris chimères dénuée de cette protéine dans le compartiment hématopoïétique (191). L'ensemble des effets des EDPs sur les différents mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose et dans sa progression sont résumés dans la figure 20.

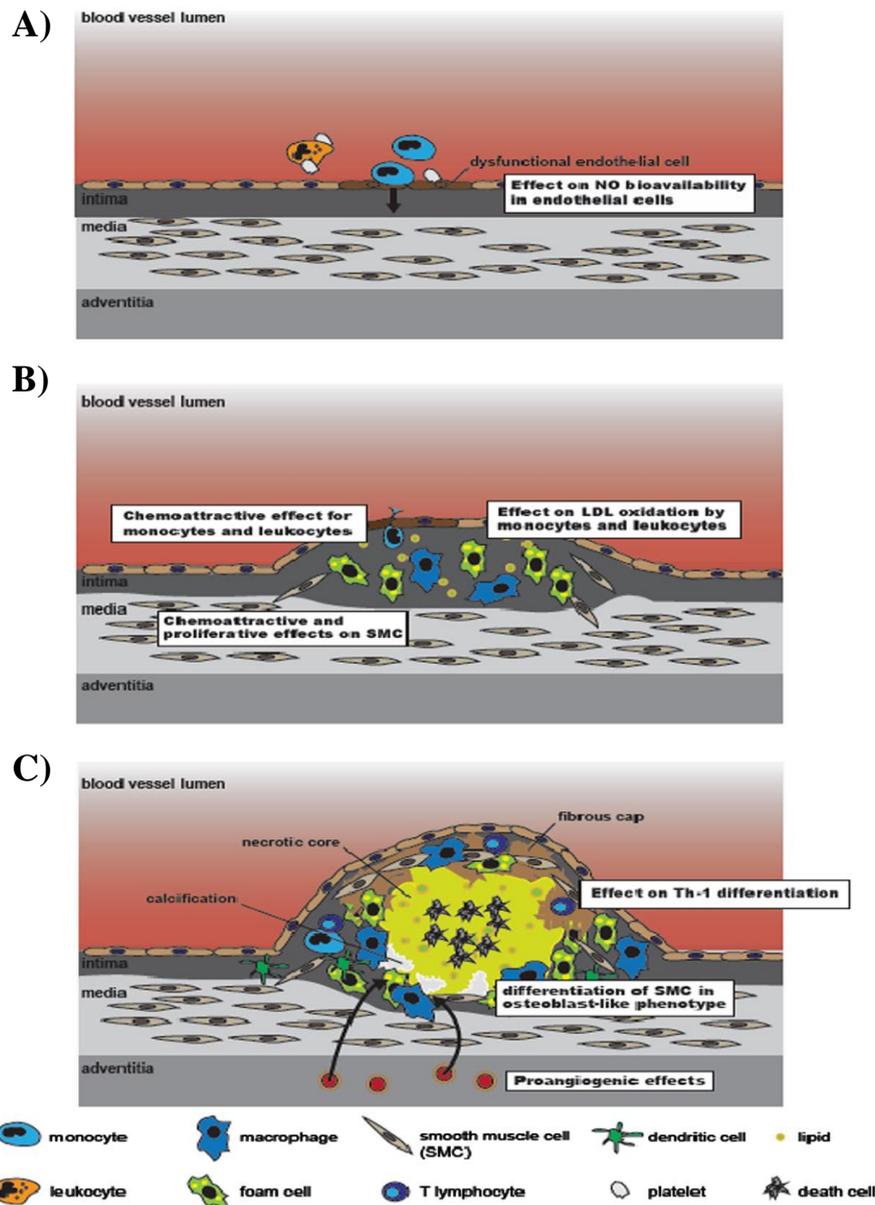


Figure 20 : Résumé de l'influence des EDPs libérés sur les différents mécanismes impliqués dans l'athérosclérose : données *in vitro*. **A)** : Le dysfonctionnement endothélial conduit à un recrutement et à une adhésion précoce des leucocytes, des plaquettes et des agrégats leucocytes-plaquettes ainsi qu'à une augmentation de la perméabilité de l'endothélium. Il a été montré que les EDPs modulent le calcium intracellulaire et la libération de NO. **B)** : Les LDLs qui s'accumulent dans l'intima sont sujettes à une modification oxydative. Les monocytes sont ensuite recrutés dans l'intima, se différencient en macrophages, accumulent les LDL oxydées et se transforment en cellules spumeuses, formant les stries lipidiques précoces. L'accumulation successive de monocytes et leucocytes, et le dépôt de matrice riche en collagène associé au recrutement de cellules musculaires lisses sont responsables de la progression de la plaque. Il a été montré que les EDPs exercent un effet chimioattractif sur les monocytes et les leucocytes, des effets chimioattractifs et prolifératifs sur les CMLs et augmentent l'oxydation des LDL par les monocytes et les leucocytes. **C)** : Le cœur nécrotique de la plaque est soumis à la formation de calcifications et au développement d'une chape fibreuse formée principalement de CMLs. Il a été suggéré que les EDPs pourraient participer à l'ostéodifférenciation des CMLs mais aussi à la polarisation des lymphocytes T en Th-1. NO, nitric oxyde; LDL, low-density lipoprotein; SMC, smooth muscle cell; Th-1, T-helper cell-1. D'après Maurice et al., 2013 (206)

Il est cependant important de noter que nombre de ces éléments n'ont été proposés qu'à partir de résultats *in vitro* et que peu, voire pas, d'éléments *in vivo* ne sont disponibles pour valider ceux-ci.

2.2.5.2. Les calcifications vasculaires

Très peu de données montrant un rôle direct des EDPs sur le développement des calcifications vasculaires sont disponibles, bien qu'il fût suggéré comme décrit précédemment que des EDPs qui pourraient participer à l'ostéodifférenciation des CMLs (228). Cependant, cette étude fût menée avec de l' α -élastine, dont la pertinence physiologique n'a pas été démontrée. Il est cependant bien connu que des élastases sont sécrétées dans l'espace extracellulaire au cours de l'IRC, dégradant les fibres élastiques. L'élastolyse associée joue un rôle prédominant dans l'initiation et la progression des calcifications vasculaires car l'élastine dégradée présente une forte affinité pour le calcium favorisant le dépôt d'hydroxyapatite le long des fibres élastiques appelé l'élastocalcinose (233). Ainsi, le rôle des EDPs dans le processus de calcification au cours de l'IRC reste encore à étudier en détail, tout comme le(s) mécanisme(s) conduisant à leur production.

Dans ce cadre, de nouveaux acteurs ont été identifiés et pourraient jouer un rôle fondamental dans l'induction des calcifications vasculaires au cours de l'IRC, mais également participer à l'élastolyse observée. Ainsi, notre équipe a mis en évidence l'implication du récepteur aux produits de glycation avancée (RAGE) dans les processus d'athérosclérose et de calcification associés à l'IRC, bien que son rôle précis reste encore à démontrer.

C. Le récepteur aux produits de glycation avancée (RAGE) : implication dans les processus liés à l'IRC

La découverte de RAGE, au début des années 90, fait suite à l'identification d'un nouveau récepteur capable de fixer des protéines modifiées par du glucose à la surface de cellules endothéliales bovines (234). Ces études ont alors mise en évidence que ce récepteur est capable de fixer divers ligands ce qui a permis de le classer dans la famille des récepteurs reconnaissant des motifs ou *Pattern Recognition Receptor*.

Dans l'organisme, RAGE est principalement retrouvé dans le poumon où il est exprimé par les cellules épithéliales alvéolaires (235). Cependant un taux très faible de RAGE est aussi retrouvé au niveau du cerveau, du cœur, du rein et du muscle squelettique. D'un point de vue cellulaire, il est exprimé par divers types cellulaires en plus des cellules épithéliales comme les monocytes /macrophages, les CMLs, les lymphocytes T, les neutrophiles (235,236)

Cependant, le développement de certaines pathologies cardiovasculaires (237), tumorales (238) ou neurodégénératives (239) est associé à une augmentation significative de l'expression de ce récepteur, suggérant que RAGE pourrait être un acteur moléculaire crucial dans le développement de diverses pathologies.

1. Organisation structurale de RAGE

Chez l'Homme, le gène AGER (Q15109) se situe sur le chromosome 6 et sur le chromosome 17 chez la souris (Q62151). Il est composé de 11 introns/exons subissant des épissages alternatifs afin de produire les différents variants. La protéine mature (Figure 21) faisant de 45 à 50 kDa, est composée de 404 acides aminés et présente un domaine extracellulaire, une seule hélice transmembranaire et un court domaine cytosolique (240). Le domaine extracellulaire est constituée d'*Immunoglobulin-like domains* comprenant un domaine variable V et deux domaines constants C appelés les domaines C1 et C2 (241).

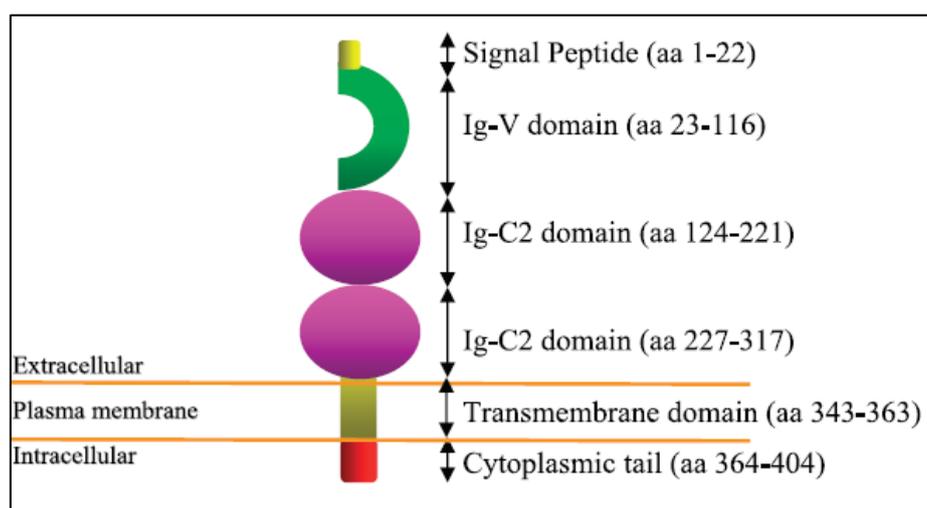


Figure 21 : Représentation schématique de la protéine. RAGE est composé d'une partie extracellulaire contenant 3 domaines, d'une partie transmembranaire et d'une partie cytosolique. D'après Hudson et al, 2008 (242).

Les domaines V et C1 sont liés par un ensemble d'acides aminés sans structure secondaire apparente fonctionnant comme une unité structurale et non comme des domaines individuels. Ce complexe est relié au domaine C2 par un ensemble d'acides aminés formant un lien élastique entre les deux (243). L'analyse moléculaire de ces domaines a montré que ce domaine V possède une majorité d'acides aminés chargés positivement, particulièrement arginine et lysine, alors que le domaine C2 possède majoritairement des acides aminés et donc chargés négativement. La majeure partie des ligands de ce récepteur se fixent sur le domaine V. Le domaine C2 participe à la reconnaissance du ligand et à la stabilisation du domaine V (244). La partie cytoplasmique, hautement chargée, est indispensable pour l'activation des voies de signalisation telles que la voie NF- κ B (245).

Il existe 20 isoformes de RAGE, identifiés dans différents tissus, et possédant diverses localisations cellulaires. Cependant les formes de RAGE les plus retrouvées dans l'organisme sont la forme entière "*full length*" (fl-RAGE) ancrée à la membrane plasmique et correspondant à celle décrite précédemment, et la forme sécrétée (sRAGE) qui ne contient que la partie extracellulaire du récepteur (Figure 22). Cette dernière est produite suite à un épissage alternatif de l'ARNm ou suite à un clivage protéolytique de la protéine par ADAM10 ou par des MMPs telles que la MMP-9 (246). Cette forme du récepteur libérée dans l'espace extracellulaire interagit alors avec les ligands circulants de la fl-RAGE. Elle diminue donc l'activation de RAGE en empêchant la fixation des ligands (247).

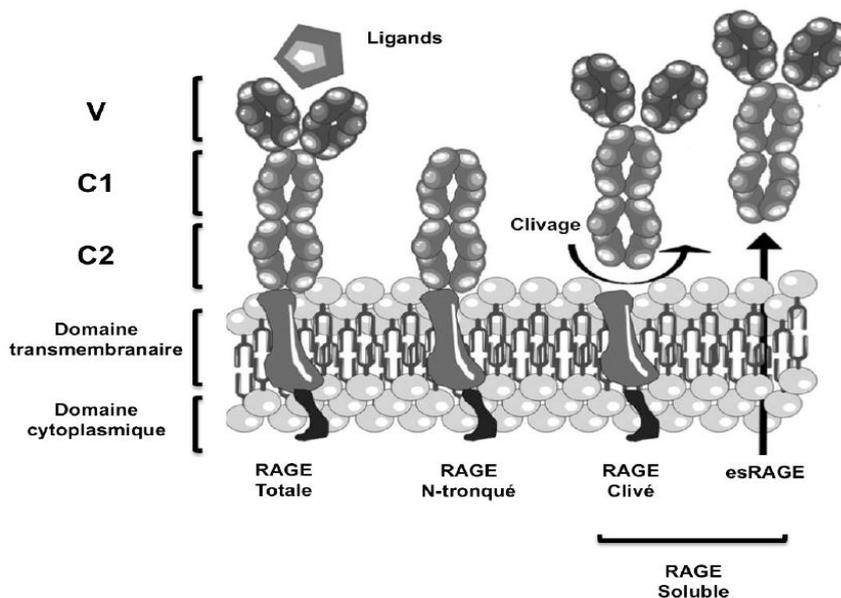


Figure 22 : Schéma représentatif des différents isoformes de RAGE. *RAGE est secrété dans l'espace extracellulaire sous forme de sRAGE à la suite de l'action de protéases ou sous forme de esRAGE après un épissage alternatif. D'après Basta et al, 2008 (248).*

L'étude biochimique de ce récepteur a montré que RAGE forme des oligomères constitutifs d'au moins 4 molécules à la surface de la membrane plasmique (249) permettant la transduction du signal suite à la fixation du ligand. Le lien entre les récepteurs s'effectue au niveau des domaines V-C1 qui forment des contacts latéraux au niveau des résidus du domaine C1 principalement. Au niveau de la surface de contact, de nombreux résidus chargés sont présents et la liaison à ce niveau se réalise par des liaisons hydrogène et des interactions polaires contrôlées au niveau d'un ion zinc. Cet ensemble de récepteur est stabilisé par la fixation de ligands multimériques comme le S100B, S100A12 ou les AGEs. Ce mécanisme augmentant le nombre de récepteurs à la surface pourrait expliquer l'hyperactivation de la voie RAGE dans les maladies inflammatoires chroniques grâce à un rétrocontrôle positif sur l'expression de RAGE (250).

2. Les différents mécanismes impliqués dans la régulation de RAGE

2.1. Régulation au niveau transcriptionnel

La régulation transcriptionnelle de RAGE fait intervenir plusieurs facteurs de transcription tels que SP-1, AP-2, NF- κ B (251). La région promotrice de RAGE -1543/-587 bp

est constituée de deux sites de fixation pour NF- κ B. Ce facteur de transcription est activé par la cascade de signalisation initiée par les *Toll Like Receptor* (TLR) ou par des cytokines pro-inflammatoires libérées par les leucocytes. En aval de ces sites, plusieurs domaines de fixation du facteur de transcription SP1 sont retrouvés dans la région -245/-40. Cette région est essentielle dans la réponse cellulaire après la fixation de *High Mobility Group Box-1* (HMGB1) sur le récepteur RAGE au cours du développement du cerveau.

Dans cette région promotrice a également été identifiée deux polymorphismes, -374T/A et -429T/C qui ne sont pas localisés dans les domaines précédemment décrits. Cependant, ces régions sont associées aux développements de l'athérosclérose et aux complications cardiaques (252).

2.2. Régulation par épissage alternatif

Il a été mis en évidence l'existence de 20 produits provenant de l'épissage alternatif de l'ARN de RAGE humain (253) et murin (254). Cependant, une très faible partie de ces variants est traduite en protéine et est exprimée en quantité suffisante pour induire les cascades de signalisation. En effet, 50 % des produits d'épissage sont ciblés et dégradés. Il a été montré que le niveau de transcrite ne reflète pas nécessairement la quantité de protéine dans le plasma. En effet, un modèle murin de diabète présente un niveau élevé du transcrite pour sRAGE mais la protéine ne se retrouve pas augmentée dans le plasma des souris (254).

Les principaux variants d'épissage retrouvés chez l'Homme sont le récepteur RAGE entier, le variant 1 (Srage) et enfin le variant 2 correspondant au dominant négatif de RAGE avec le domaine V tronqué. Ces variants d'épissage ne sont pas fonctionnels mais ce sont d'importants biomarqueurs des pathologies liées à l'interaction de RAGE avec ses ligands. En effet, le plasma de patients diabétiques montre par exemple une corrélation inverse de l'expression de RAGE-V1 avec le développement accéléré de l'athérosclérose (255).

2.3. Régulation au niveau de la protéine

2.3.1. Glycosylation

RAGE présente 2 sites de N-glycosylation au niveau des asparagines 25 et 81 qui modifient la fixation du ligand ainsi que la signalisation du récepteur. De plus, il existe un polymorphisme de RAGE chez l'Homme résultant de la substitution d'une glycine par une

sérine en position 82 ce qui favorise la glycosylation de ce résidu. Ceci augmente la fixation des ligands et par conséquent l'activation de RAGE (256).

2.3.2. Clivage protéolytique de RAGE

Tel que précisé précédemment, la présence de RAGE à la surface cellulaire est aussi régulée par un clivage protéolytique de ce récepteur. Il a été montré que la MMP-9 et l'ADAM10 clivent la partie extracellulaire proche du domaine transmembranaire libérant la forme sRAGE dans le milieu extracellulaire (246,257). Ce clivage peut être régulé par des ligands de RAGE qui en se fixant active ce récepteur mais aussi son clivage protéolytique. C'est un potentiel mécanisme inhibiteur de RAGE puisque la forme sRAGE entre en compétition avec RAGE pour la fixation des ligands. De plus, ce mécanisme de régulation peut être régulé par une augmentation de concentration calcique intracellulaire qui est induite par les récepteurs couplés aux protéines G comme le récepteur V2 de la vasopressine ou le récepteur de l'ocytocine (258,259).

3. Les ligands de RAGE

3.1. AGEs : les produits de glycation avancés

La glycation d'une protéine est une réaction non enzymatique se produisant avec un glucide au niveau du groupement amine libre. C'est une réaction spontanée, irréversible et cumulative aboutissant à la formation de produits de glycation avancée (AGEs). L'apport d'AGE se fait soit de façon endogène ou exogène par la nourriture dû à la méthode de cuisson (260).

Dans les conditions physiologiques, une faible concentration de glycation endogène est observée alors que celle-ci se trouve augmentée au cours de certaines pathologies et du vieillissement. L'hyperglycémie associée au diabète favorise par exemple la glycation de nombreuses protéines telles que le collagène ou l'albumine. L'accumulation d'AGEs au cours de cette pathologie participe à la progression de nombreuses complications comme la néphropathie diabétique (261). Les AGEs sont obtenus selon 3 voies de production : la glycation non-enzymatique, la glycoxydation et la voie des polyols (Figure 23) (262).

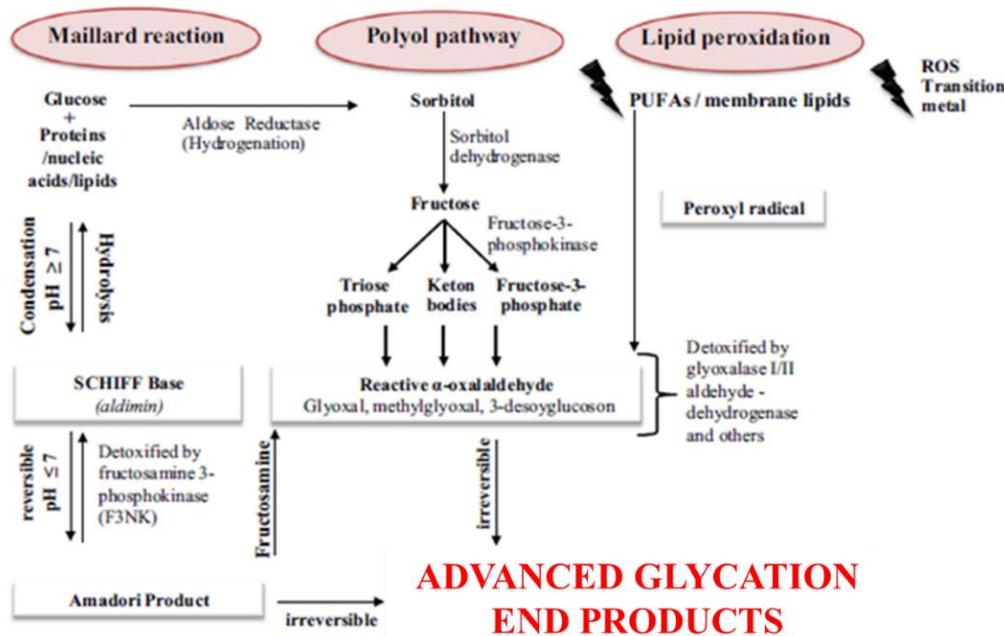


Figure 23 : Schéma représentatif des différentes voies de formation des AGEs *in vivo*. La formation endogène d'AGEs a été décrite par trois voies différentes *in vivo* : la réaction non enzymatique de Maillard, la voie de polyol et la peroxydation lipidique. Au cours des trois réactions, la formation d'AGEs produit des composés carbonyles réactifs tels que le glyoxal, le méthylglyoxal et le 3-désoxyglucoson. Lors de conditions pathologiques au cours desquelles la détoxification est altérée, ces composés très réactifs forment des AGEs de façon irréversible. Modifié d'après Ott et al, 2014 (262).

Le glucose est l'ose principalement impliqué dans la glycation endogène et réagit avec un groupement aminé libre présent sur des protéines ou des lipides. La première étape consiste en une condensation entre le groupement aminé libre de la protéine et le groupement carbonyle du sucre formant une base de Schiff. C'est un processus réversible par hydrolyse chimique. Un réarrangement moléculaire nommé réarrangement d'Amadori va alors s'effectuer menant à la formation du produit d'Amadori stable. À partir de cette étape, les AGEs peuvent directement être produits sans étapes intermédiaires ou ils peuvent être obtenus après différentes modifications du résidu glucidique. Lors de ce processus, une partie du résidu se détache formant des produits intermédiaires de glycation tels que les aldéhydes glyoxals et mathylglyoxals qui sont très réactifs. Ces derniers en se fixant à d'autres protéines conduisent aussi à la production AGEs (Figure 24) (263).

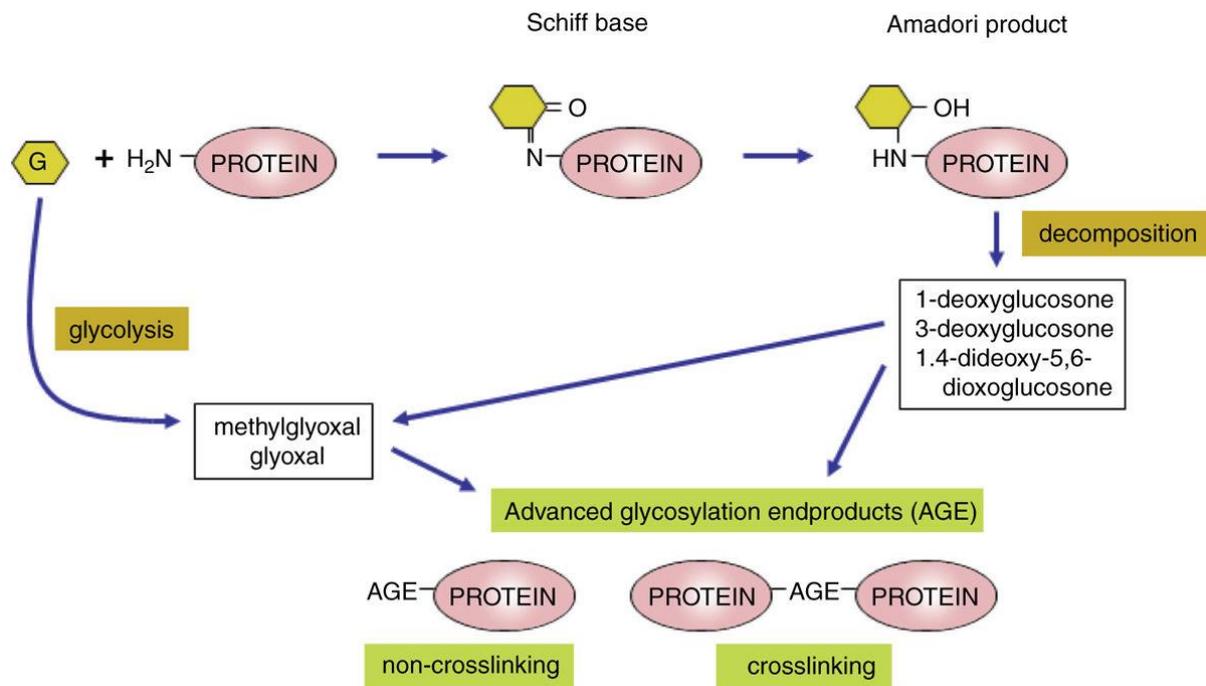


Figure 24 : Schéma représentatif du processus de formation des AGEs par glycation endogène
D'après Vallon et al, 2011 (263)

La glycoxydation est une réaction non-enzymatique qui dépend de la concentration en sucre mais aussi de l'importance du stress oxydant provenant de l'auto-oxydation du glucose ou de la peroxydation des lipides. Les produits intermédiaires ainsi formés réagissent avec un groupement aminé conduisant à la production des AGEs tels que la N ϵ -carboxyméthyl-lysine. Cette réaction est la principale voie de formations des AGEs au cours de l'IRC (264).

La dernière voie implique la voie des polyols qui fait intervenir comme sucre le fructose. Cette réaction forme des AGEs en passant par les produits intermédiaires de la glycation (262).

Des mécanismes endogènes de détoxification permettant de limiter l'accumulation des AGEs ont été mis en évidence. La glyoxalase-1 est, par exemple, une enzyme qui empêche la formation de méthylglyoxal, glyoxal et d' α -oxoaldéhydes, produits intermédiaires retrouvés au cours de la glycation. Cependant l'induction d'un stress oxydant par la liaison AGEs-RAGE diminue l'activité et l'expression de la glyoxalase-I. Ceci participe à l'augmentation de la production des AGEs (265,266).

3.2. Les autres ligands

3.2.1. Sérum Amyéloïde A

La sérum amyéloïde A (SAA) est une protéine exprimée au cours de la phase aigüe de l'inflammation et peut être sécrétée de 100 à 1000 fois sa valeur basale (267). Lors d'une régression de l'inflammation, la SAA diminue rapidement puisque sa demi-vie est de 12 h. Elle appartient à la famille des apolipoprotéines associées aux *High Density Lipoprotein* (HDL) (268).

Une étude clinique a également mis une évidence une corrélation entre le taux de SAA et les facteurs de risques cardiovasculaires. En effet, la SAA est fortement retrouvée chez les patients présentant des plaques d'athérosclérose à un stade avancé (269). De plus, chez des souris ApoE^{-/-}, la SAA s'accumule dans les lésions athérosclérotiques et son expression est maintenue tout au long de la progression de cette pathologie (270). Notre équipe a également montré que l'IRC induit une accumulation de SAA et de RAGE dans les crosses aortiques de souris urémiques ApoE^{-/-}. En parallèle de ces observations, nos résultats montrent aussi que la SAA participe à la migration des CMLs mais aussi à l'induction du stress oxydant de façon RAGE dépendante (271).

3.2.2. High Mobility Group Box protein-1 (HMGB-1)

HMGB-1 est une protéine de 30 kDa qui est composée de trois domaines : deux domaines chargés positivement (A et B) et un domaine chargé négativement (queue acide en C-terminal). Cette structure lui confère la capacité de reconnaître et de se fixer sur l'ADN et les histones. Son rôle dans le noyau est de modifier la structure nucléosomique pour réguler les mécanismes de transcription, de recombinaison et de réparation (272). Elle est ainsi localisée dans le noyau mais peut aussi être sécrétée dans le milieu extracellulaire et est retrouvée dans le sérum de patient atteints de pathologies inflammatoire telles que l'arthrite rhumatoïde (273). L'utilisation de modèle murin a montré qu'un traitement avec HMGB-1 induit le développement d'arthrite en activant les macrophages *via* la libération de l'IL-1 (274).

Elle est capable de se lier avec de nombreux récepteurs comme les TLR ou encore le récepteur RAGE (275). Cette interaction avec le récepteur RAGE participe à l'induction de l'autophagie et participe à la résistance aux agents cytotoxiques dans le cadre du cancer (276).

Concernant les pathologies vasculaires, une étude clinique a montré une forte expression de cette protéine au niveau des CMLs et des cellules endothéliales localisées dans les lésions athérosclérotiques. En parallèle de ces observations, une stimulation athérogénique entraîne l'expression de HMGB1 par les CMLs ce qui active leur migration et leur prolifération grâce à l'interaction HMGB1-RAGE (277).

3.2.3. Les protéines de la famille de S100

Les protéines de la famille S100, ou calgranuline, sont composées de 24 protéines différentes de faible poids moléculaire (10-14kDa). Elles sont capables de former des homo- et des hétérodimères qui peuvent lier le calcium. Elles possèdent toutes la caractéristique d'être soluble dans une solution de sulfate d'ammonium saturée à 100% ce qui a donné leur nom. Ces protéines agissent comme des régulateurs intracellulaires mais aussi comme des protéines de signalisation extracellulaire pouvant réguler des processus cellulaires de façon paracrine ou autocrine (278). Elles sont ainsi impliquées dans diverses fonctions cellulaires telles que la signalisation, la différenciation, la migration, la transcription mais également dans le cycle cellulaire grâce à leur capacité à fixer le calcium ou le zinc (279). En plus de ces fonctions intracellulaires, certaines d'entre elles peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire et avoir des fonctions dans l'inflammation (S100A12, (280)), sur l'activité des neutrophiles (S100B, (281)) ou encore des effets dans l'angiogenèse (S100A4, (282)) . Cependant, toutes ces fonctions extracellulaires nécessitent une interaction avec un récepteur. RAGE semble être un bon candidat car il été montré que ce récepteur est activé par le S100A12 ou le S100B (283). De plus, un lien a été établi entre S100A12 et les calcifications vasculaires car cette protéine augmente l'ostéodifférenciation des CMLs, processus ralenti en présence de sRAGE (284).

4. Signalisation

Le domaine cytoplasmique de RAGE est essentiel pour la transduction du signal après la fixation de ligands permettant l'activation de gènes pour une réponse cellulaire adaptée. Des études *in vitro* à l'aide de récepteur mutant dénués de ce domaine, a montré un blocage de l'activation des cascades de signalisation dépendantes de RAGE (285). Des expériences de double hybride ont permis d'identifier un partenaire intracellulaire, le domaine FH1 de *Diaphanous related formin 1* (mDia1) (286). mDia1 est un membre de la famille des formines

riches en proline interagissant avec diverses molécules de transduction du signal comme c-Src (287). La fixation de mDia1 induit l'activation de Rac-1 et de Cdc42 entraînant la migration cellulaire, et participe à la régulation de l'hypoxie induite par RAGE *via Early growth response-1* (Egr-1) (286,288). Ainsi, il a été identifié quatre voies de signalisations différentes activées à la suite du recrutement de mDia1 sur la domaine cytosolique de RAGE : la voie JAK/STAT ; les voies MAPK ERK1/2, p38, et JNK ; la voie Ras-Rac-Cdc42 et la voie PI3K/Akt (Figure 25) (289).

L'utilisation de mutants de RAGE présentant différentes délétions sur ce domaine cytoplasmique a permis de mettre en évidence une interaction directe de ERK/2 sur le domaine cytosolique de RAGE. Cela s'explique par la présence de séquences similaires au domaine D, site de fixation de ERK1/2 retrouvé dans certains substrats de celui-ci (290). L'ensemble de ces voies de signalisation mènent à la fixation de divers facteurs de transcription tels que NF- κ B, des protéines de la famille des STAT telles STAT1/STAT3/STAT5, et AP- permettant une réponse cellulaire adaptée au stimulus. À titre d'exemple, la stimulation de RAGE par S100B induit l'interaction avec mDia1 activant c-Src responsable de la phosphorylation des voies ERK1/2 et PI3K/Akt. Cela conduit à l'activation de STAT3 induisant la migration et l'expression de gènes pro-inflammatoires (291).

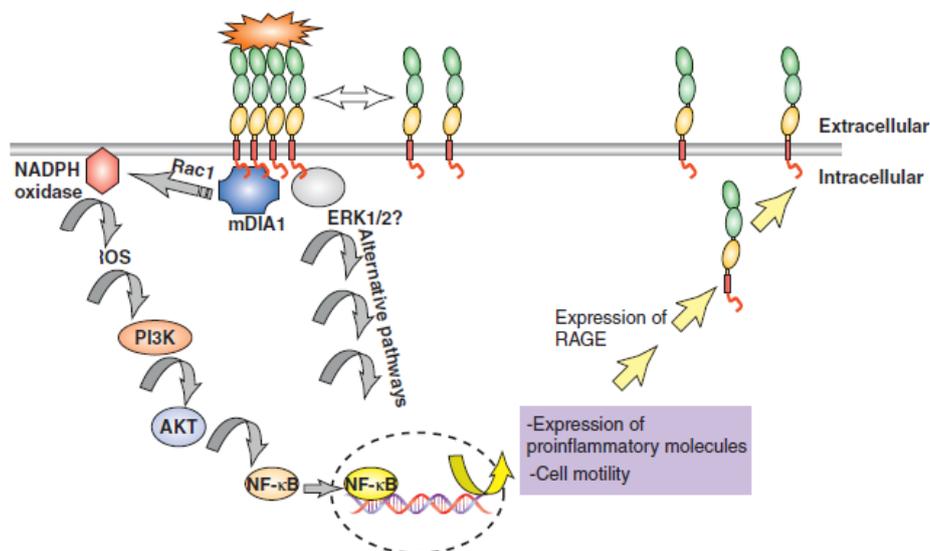


Figure 25 : Schéma des voies de signalisation principales activées après fixation d'un ligand sur RAGE. La fixation de ligand entraîne l'oligomérisation de récepteur RAGE. La fixation d'un adaptateur intracellulaire, mDia1, active diverses cascades signalétiques induisant l'expression de gènes impliqués dans la migration ou la production de cytokines pro-inflammatoires. De plus, une boucle de rétrocontrôle positif maintient l'expression de RAGE stimulant les voies de signalisation activées. D'après Fritz et al, 2011 (241).

5. Rôle de RAGE dans le remodelage vasculaire pathologique

5.1. Implication de RAGE dans le développement de l'athérosclérose

Le rôle pro-inflammatoire de RAGE a encouragé de nombreuses équipes à étudier son implication dans les mécanismes associés à l'athérosclérose. Une étude clinique menée sur des monocytes de patients atteints d'IRC à différents stades montre une augmentation des AGEs, qui en se fixant sur RAGE, induit l'amplification de la production du TNF α et l'expression de RAGE, en corrélation avec la progression de cette pathologie. Ces résultats suggèrent donc que RAGE et ses ligands participent activement à l'inflammation systémique retrouvée au cours des défaillances rénales (292). Ces données ont été confirmées par l'utilisation de sérum de patients urémiques montrant une augmentation progressive de l'expression du S100A12 avec l'avancée de la maladie (293). Ces données cliniques ont été confirmées et approfondies par des études *in vitro* et *in vivo* afin de comprendre le rôle de RAGE dans l'athérosclérose.

Au sein de la paroi vasculaire, la première conséquence de l'interaction de RAGE avec ses ligands est l'induction d'un stress oxydant (294), en partie grâce à l'activation de la NAD(P)H oxydase (295). Dans les cellules endothéliales, la principale source de ROS est la mitochondrie (296). Les étapes précoces du développement de l'athérosclérose sont caractérisées notamment par un dysfonctionnement endothélial associé à une production de ROS. De plus, les AGEs ou le S100A12 en se fixant sur RAGE, induisent l'expression de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 ou ICAM-1 permettant le recrutement des monocytes sur l'endothélium (297,298). Cette interaction participe également à leur migration (299). Enfin, la fixation de ligands induit un phénotype pro-thrombotique de la surface de l'endothélium (300).

Au cours de l'athérosclérose, la composante inflammatoire joue un rôle essentiel dans la progression des lésions. Il a été démontré que les AGEs induisent la polarisation des macrophages en un phénotype M1 pro-inflammatoire en libérant de l'IL-1 β ou du TNF- α (301,302). Ce phénotype pro-inflammatoire est dû à la fixation des AGEs sur RAGE, induisant la voie de signalisation NF- κ B (303).

Les AGEs, interviennent de plus dans la formation des cellules spumeuses en augmentant le nombre de récepteurs aux LDL oxydés tel CD36 et en diminuant l'élimination du cholestérol en HDL (304). Ce processus accélère le développement de l'athérosclérose.

Enfin, l'association AGE/RAGE à la membrane des CMLs induit une augmentation de la migration et de la prolifération (305) et participe à l'augmentation de la sécrétion de MEC par ces cellules *via* une augmentation du TGF- β (306).

Toutes ces données ont été confirmées *in vivo* par l'utilisation de modèle ApoE^{-/-} présentant une délétion pour RAGE. Les résultats montrent que chez ces souris, l'expression de RAGE est augmentée au cours de la progression de la pathologie. La délétion de RAGE dans ce modèle impact divers mécanismes associés à l'athérosclérose. En effet, les observations *in vivo* montrent une diminution des plaques et de sa complexité. De plus, les données mettent en évidence que l'absence de RAGE entraîne une diminution de l'expression de molécules d'adhésion comme VCAM-1 ou ICAM-1, de la MMP-2 et d'IL-10 (237,307)

L'ensemble de ces résultats permettent de définir RAGE comme un acteur crucial dans la progression de l'athérosclérose associée à l'IRC. RAGE est également impliqué dans les complications cardiovasculaires associées à l'IRC que sont les calcifications vasculaires.

5.2. RAGE : un acteur clef dans les processus de calcifications vasculaires

L'utilisation de souris ApoE^{-/-} possédant des CMLs chez lesquelles l'expression du S100A12 est induite génétiquement ont mis en évidence la présence de calcifications importantes et plus précoces par rapport aux souris ApoE^{-/-}. En parallèle de ces observations, l'analyse transcriptomique de marqueurs ostéogéniques montre une importante augmentation de RunX2 dans un environnement favorisant le développement de plaques d'athérosclérose (308). Ces données ont été soutenues par des résultats obtenus *in vitro* avec des CMLs. L'induction de l'expression de RAGE induit un dépôt de calcium associé à une augmentation de l'expression de l'*Alkaline Phosphatase* (ALP) et de Msx2 (facteur de transcription impliqué dans l'ostéodifférenciation) (309) et l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-RAGE bloque l'influence pro-calcifiante des AGEs (310). Il semblerait de plus qu'une partie des mécanismes d'ostéodifférenciation dépendants de RAGE fasse intervenir le stress oxydant. En effet, suite à l'ostéodifférenciation des CMLs par des AGEs, une augmentation de la NADPH associée à une libération d'espèces réactives de l'oxygène est observée (311).

Malgré ces données, le rôle de RAGE dans les calcifications vasculaires reste encore à confirmer particulièrement au niveau des relais moléculaires. Ce récepteur pro-inflammatoire

pourrait en effet, en plus de son effet pro-calcifiant direct, utiliser des relais moléculaires divers tel la CathS dont l'expression a été reliée à des processus semblables.

D. La cathepsine S : une protéase matricielle impliquée dans le remodelage vasculaire

1. Généralités

Le terme cathepsine a été introduit à partir de 1920 (312) et provient du grec *kathepsin* signifiant digérer. Ce nom a été attribué aux enzymes protéolytiques lysosomales. Dans ce groupe d'enzymes, on trouve les sérines protéases telles que les cathepsines A et G, les protéases aspartiques comme les cathepsines D et E et enfin les cathepsines lysosomales à cystéine. L'analyse bio-informatique du génome humain a identifié 11 cathepsines à cystéine parmi lesquelles on retrouve les cathepsines B, C, F, H, K, L, O, S, V, X et W (313). Ces cathepsines à cystéine sont divisées en deux sous-groupes comprenant les exopeptidases avec les cathepsines C,X et B mais la majorité des cathepsines à cystéine sont des endopeptidases.

Les cathepsines lysosomales à cystéine nécessitent un environnement acide et réducteur, comme retrouvé dans les lysosomes, pour avoir une activité optimale leur permettant d'assurer la dégradation non-spécifique intracellulaire et extracellulaire de protéines. Lors de leur découverte, elles ont été considérées comme de simples protéases lysosomales dont la fonction est de dégrader les protéines intracellulaires dans les lysosomes et endosomes. Cependant, de nombreuses études ont montré un rôle plus complexe de ces protéases pouvant participer activement au développement de pathologies. Parmi ces cathepsines, une cystéine protéase, la CathS, a été identifiée comme une potentielle élastase pouvant jouer un rôle important dans le développement des maladies cardiovasculaires par son implication dans la dégradation de la MEC ainsi que dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Il est, cependant, important de noter que son rôle dans la production d'EDPs bioactifs n'a jamais été démontré.

2. Du gène à la protéine

La CathS est produite par le gène CTSS localisé sur le chromosome 1q21 contenant 6 exons et 6 introns (Figure 26). La région 5' ne contient pas les motifs classiques tels que TATA ou CAAT mais elle est composée d'une région riche en GC. Il a également été identifié la présence de domaine d'interaction AP-1 et des microsatellites CA suggérant que le promoteur de CTSS est hautement régulé (314).

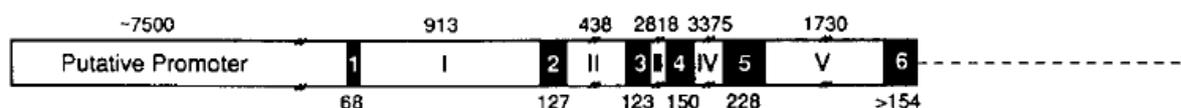


Figure 26 : Organisation du gène de la CathS, CTSS. Les cadres blancs représentent les introns et les cadres foncés les exons. De part et d'autre de chaque cadre est noté la longueur de chacun en paires de base. D'après Shi et al, 1994 (314).

Comme toutes les cathepsines, la CathS est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique, sous forme de pré-proenzyme (zymogène) de 331 acides aminés, contenant un peptide signal au niveau de la pré-région à l'extrémité N-terminale, un pro-domaine et un domaine mature de 16, 98, 217 acides aminés respectivement (315). Le peptide signal est éliminé dans la lumière du réticulum endoplasmique formant la pro-cathepsine S qui subit différentes modifications post-traductionnelles telles que des glycosylations, des phosphorylations et la formation des ponts disulfures dans l'appareil de Golgi. Enfin, après avoir adopté un repliement correct, la CathS est transportée dans les endosomes ou les lysosomes où elle est activée par élimination du pro-domaine.

Ce propeptide est nécessaire pour le repliement correct de l'enzyme et sa stabilité impliquant un ensemble d'acides aminés aromatiques qui sont les amino-acides W28, W31 et W52 (316). Ce prodomaine est constitué de deux parties dont la partie N-terminale présentant deux hélices α et un brin β , qui forment un mini-domaine compact. Cette partie du pro-domaine interagit avec une boucle *proregion binding loop* au niveau du domaine catalytique ce qui stabilise son positionnement. La partie C-terminale s'étend à la surface de l'enzyme en passant par le site actif avec la formation d'une hélice α . Ce domaine crée alors un encombrement stérique bloquant l'accès aux substrats protéiques. Ce pro-domaine sert donc d'inhibiteur spécifique de l'enzyme afin d'éviter une maturation précoce (317). Lors du processus de maturation, le pro-domaine est éliminé par divers processus dans les lysosomes. Cette étape

peut se faire par l'intervention d'autres protéases telle la cathepsine D ou la pepsine (318). De plus, ces endopeptidases possèdent la capacité de s'auto-activer à pH acide (pH = 4,5), soit par un processus intermoléculaire dans lequel une cathepsine active va cliver le prodomaine d'une autre cathepsine, soit par un processus intramoléculaire où le prodomaine adopte une conformation relâchée due au pH acide permettant l'auto-maturation de l'enzyme. Pour la CathS, plusieurs mécanismes ont été mis en évidence dont un clivage du pro-domaine par la cathepsine H. Le pH acide des lysosomes peut agir également sur la structure de ce pro-domaine permettant la libération du site catalytique (319). Enfin, il a été montré que l'auto-activation de la CathS était beaucoup plus rapide en présence de glycosaminoglycanes tels que la chondroïtine sulfate (320)(321).

3. Structure moléculaire et fixation des ligands

L'étude de la CathS a révélé la présence de trois ponts disulfure (C136-C180, C170-C213, Cys272-C320) avec l'implication directe des résidus C25, H164 et N184 dans le site catalytique (nomenclature UNIPROT : P25774, CathS humaine). L'utilisation de la cristallographie aux rayons X a permis de décrire précisément il y a 20 ans la structure tridimensionnelle de la CathS (322). Cette protéase est constituée d'une chaîne monomérique de 217 acides aminés possédant un domaine sous forme hélicoïdale et un domaine en tonneau constitué de 6 brins β . La juxtaposition des deux domaines crée un sillon long et étroit, bordé par des hélices d'un côté, et de l'autre par un feuillet formant le site catalytique de l'enzyme. Les coordonnées atomiques de McGrath *et al.*, (1998) n'ont pas été déposées. Depuis, 60 structures cristallographiques de la CathS complexée avec de nombreux substrats ainsi qu'une structure de la proCathS ont été déposées dans la *Protein Data Bank*.

De ces différents complexes de l'enzyme et de ses inhibiteurs, il a été possible d'identifier et de caractériser les 3 sites de fixation possible du substrat, les sites P1, P2 et P3, dont le site d'interaction est bordé par les C25 et H159, selon la nomenclature de Schechter et Berger (Figure 27). Cette nomenclature définit un arrangement des sous-sites (S-S') dans le site actif interagissant avec les résidus des sites correspondants du substrat (P-P') (323).

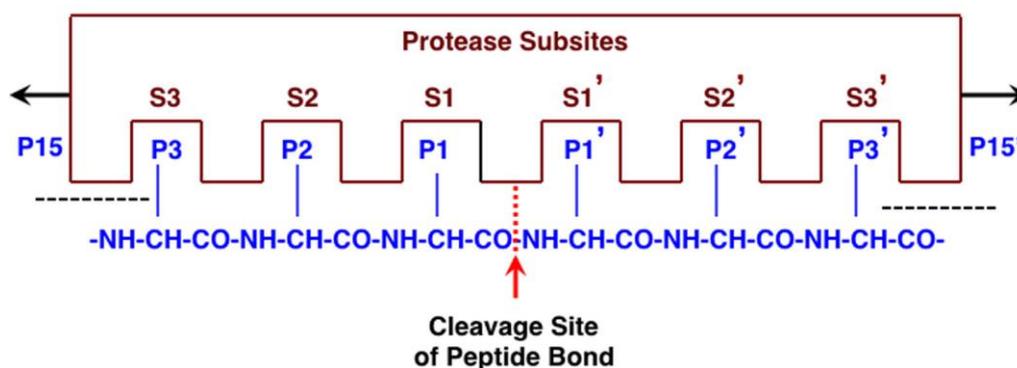


Figure 27 : Schéma illustratif de la nomenclature de Schechter et Berger. Illustration de l'interaction entre une protéase et un substrat polypeptidique en utilisant la nomenclature de Schechter et Berger. Le site actif d'une protéase est composé de plusieurs sous-sites. Ici il est constitué de 6 sous-sites appelés S1 – S3 et S1'-S3'. Les sous-sites sont situés des deux côtés du site catalytique (flèche rouge) et sont numérotés dans les deux sens. Les positions des résidus d'acides aminés du substrat ont la même numérotation que les sous-sites qu'ils occupent, P1 – P3 et P1' – P3'. Le clivage a lieu entre les résidus P1 et P1'. D'après Hook et al, 2015 (323) mais cette figure a été adaptée de Schechter et al, 1968 (324).

Des études d'arrimage moléculaire (*docking*) et de dynamique moléculaire sur le mécanisme d'action d'un inhibiteur hautement sélectif de la CathS, le RO5444101, ont mis en évidence que le site de liaison S2 est le plus important dans l'interaction (322). L'interaction P2-S2 est considérée comme le principal déterminant de la spécificité de l'enzyme grâce à la formation d'une large poche hydrophobe grâce aux résidus F70, M71, G137, V162 et F211. En effet, G137, par sa petite taille, rend la poche S2 plus profonde chez la CathS comparée à d'autres cathepsines qui ne possèdent pas ce résidu. De plus, V162 impose des restrictions d'entrée dans la poche beaucoup plus importantes par rapport aux résidus leucine et méthionine présents dans la cathepsine K et L, respectivement, nécessitant une dynamique de l'enzyme plus importante pour son mécanisme fonctionnel. Enfin, le résidu aromatique F211 est responsable d'une certaine plasticité de cette poche comparée aux autres résidus présents à cette position dans les autres cathepsines permettant l'interaction avec des inhibiteurs de taille très différente (325). Cette poche S2 par sa composition unique en acides aminés joue un rôle crucial dans l'interaction de la CathS avec ses ligands et par conséquent dans le *design* d'inhibiteurs hautement sélectifs. En collaboration avec le Pr Manuel Dauchez, la CathS, l'ensemble de ces sites et sous sites ainsi que son site catalytique a été modélisé sur la figure 28.

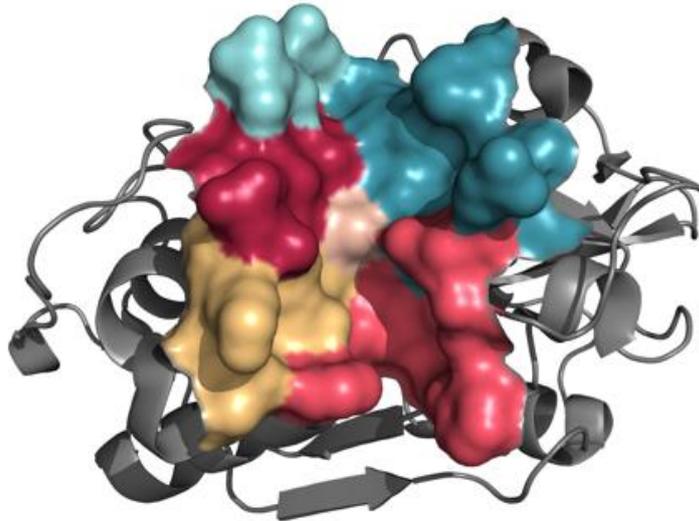


Figure 28 : Modélisation de la structure 3D de la CathS. Le site catalytique est figuré en rose pâle. Les sous-sites S1, S2, S3 sont représentés par des couleurs chaudes (rouge, rose et jaune) et les S1' et S2' par des couleurs froides (verte et bleue)

Le site catalytique se situe dans la cavité en forme de " V " située entre les deux domaines de la CathS dans laquelle on retrouve les résidus essentiels à l'activité catalytique C25, H159 et N184. Le mécanisme catalytique nécessite une réduction de la C25 pour former une liaison avec l'H159 à proximité. Le résidu N184 permet de maintenir le bon fonctionnement de H159. Ces résidus forment la triade catalytique nécessaire à l'activité protéolytique de la CathS (326).

4. Localisation et régulation de l'expression de la Cathepsine S

4.1. Expression cellulaire et tissulaire de la Cathepsine S

La majorité des cathepsines sont exprimées de façon ubiquitaire dans les tissus humains, telles que les cathepsines B, H, L, C, X, F, O, alors que d'autres présentent une expression plus restreinte comme la CathS. Des expériences d'immunomarquages ont permis de la localiser CathS dans les reins, les poumons et les ganglions lymphatiques mais surtout au niveau de la rate d'où le S pour *spleen* (327).

La CathS est exprimée par les cellules présentatrices de l'antigène comme les cellules dendritiques, les cellules B ou les macrophages (328,329). Des études complémentaires ont mis une évidence une localisation de la CathS à la membrane des CMLs vasculaires où elle pourrait

jouer un rôle dans la dégradation de la MEC (121). En effet, il a été mis en évidence qu'elle possède une activité collagénolytique, mais également élastolytique (330,331). De manière extrêmement intéressante, elle est très peu voire non exprimée dans la paroi vasculaire normale et voit son expression augmentée en conditions pathologiques (27).

4.2. Régulation de l'activité de la CathS

La régulation de l'expression et de l'activité ou l'expression de la CathS est nécessaire aux vues de ses fonctions dans la réponse immunitaire, dans l'inflammation et dans la protéolyse matricielle. Il a été démontré que son expression peut être régulée au par différentes cytokines. Des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ stimulent la sécrétion de cette cathepsine par les CMLs vasculaire (121). La présence dans son promoteur d'un *IFN-stimulated response element* (IRSE) est responsable de la régulation transcriptionnelle de la CathS induit par IFN- γ via la formation d'un complexe entre IRSE et *IFN response factor-1* (IRF-1). En parallèle, un facteur de transcription appartenant à la famille Ets, PU.1, est capable de se fixer physiquement sur le promoteur augmentant son activité et par conséquent la transcription du gène CTSS (332).

L'activité de la CathS peut être régulée par différents agents endogènes ou exogènes. Parmi les inhibiteurs endogènes, les espèces réactives de l'oxygène agissent sur son activité protéolytique, particulièrement, l'oxygène singulet, inactivant irréversiblement son activité enzymatique. En effet, en sa présence, l'activité enzymatique de cette cathepsine vis-à-vis d'un substrat fluorescent est fortement diminuée et n'est pas rétablie après l'ajout d'un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT) (333). De plus, un inhibiteur a également été identifié, au niveau physiologique, la cystatine C. Elle appartient à la famille des cystatines qui sont des inhibiteurs compétitifs et réversibles. Elle présente une très forte affinité pour la CathS et bloque son activité collagénolytique (334). De plus, l'utilisation de modèles *in vivo* ont permis de mettre en évidence une dérégulation de la balance CathS/cystatine C dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose. Dans un modèle pro-athérogène, les CMLs stimulées avec une cytokine pro-inflammatoire telle que l'IFN- γ expriment intensément la CathS lorsqu'elles présentent une délétion pour la cystatine C comparée aux cellules contrôles (335). Des inhibiteurs chimiques très spécifiques de la CathS ont également été identifiés tel que le "morpholinurea-leucine-homophenylalanin-vinyl sulfone-phenyl" (LHVS). Son utilisation sur

des CMLs vasculaires entraîne une diminution de plus de 80% de l'activité élastolytique induit par un traitement avec de l'IFN- γ (27).

5. Rôles physiologiques et pathologiques de la Cathepsine S

5.1. Rôles physiologiques

5.1.1. Rôle dans la régulation protéique

Les cathepsines participent à la maturation de diverses protéines telles que la thyroxine dont la libération est régulée par les cathepsines B, K et L (336). Concernant la CathS, son activité protéolytique participe aux clivages de différentes protéines telles que des inhibiteurs de protéases. Par exemple, la CathS est capable de cliver *Secretory Leuko Protease Inhibitor* (SLPI) ce qui a pour conséquence de bloquer son activité inhibitrice vis-à-vis de la neutrophile élastase (337).

La CathS, par son action sur les inhibiteurs de protéase, participe à la balance protéase/inhibiteur pouvant être déséquilibrée au cours de situation pathologiques.

5.1.2. Rôle dans la réponse immunitaire

La CathS est également impliquée dans la réponse immunitaire par sa fonction dans la présentation des antigènes de classe II au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ce complexe s'assemble dans le réticulum endoplasmique avec la chaîne invariante (Ii) qui contient le domaine interne (CLIP) empêchant la fixation et donc la présentation du peptide antigénique à la surface cellulaire. Le clivage de Ii est, donc, une étape essentielle dans le transfert du peptide antigénique à la surface cellulaire (338). Il a été observé qu'une inhibition de la CathS dans les lymphocytes B à l'aide de deux inhibiteurs, le E64D et le LHVS, entraîne une inhibition de la protéolyse de Ii (339). De plus, une étude plus récente confirme ces données dans les cellules dendritiques ce qui permet la présentation correcte du peptide antigénique et donc une réponse immunitaire adaptée (340). Cet effet sur la réponse immunitaire a été retrouvé dans un modèle *in vivo* d'athérosclérose utilisant des souris LDLR^{-/-}/CathS^{-/-} chez lesquelles une diminution des lymphocytes ainsi que de l'IFN- γ , est observée en parallèle d'une diminution des plaques d'athérome (232). Ces données montrent la CathS joue un rôle dans la progression de cette pathologie par son implication dans la réponse immunitaire et inflammatoire.

5.1.3. Rôle dans l'adhésion et l'invasion cellulaire

Lors de réponses inflammatoires telles que celles décrites au cours de l'athérosclérose, les leucocytes sont recrutés et adhèrent sur l'endothélium. Ceci est dû à l'expression de molécule d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales telles que VCAM-1 ou encore par l'expression de molécules chimioattractantes comme MCP-1. Une étude a montré une diminution de l'expression de ces molécules lorsque que la CathS est non exprimée dans un modèle murin d'athérosclérose (232).

Il faut noter, de plus, que la CathS joue un rôle dans l'invasion des CMLs vasculaires permettant leur migration de la média à l'intima lors de la progression de lésions athérosclérotiques. Un étude *in vitro* utilisant des CMLs humaines a montré que la CathS est localisée à la membrane plasmique de ces cellules. De plus, l'utilisation du LHVS entraîne une diminution drastique de l'invasion de CMLs humaines à travers une matrice de collagène de type I ou d'élastine. Ainsi la distribution de la CathS à la membrane de CMLs permet alors la dégradation de protéine matricielle, au niveau péri-cellulaire comme le collagène et l'élastine facilitant l'invasion de ces cellules à travers les différentes tuniques de la paroi vasculaire (121).

5.1.4. Rôle dans l'angiogenèse

L'angiogenèse permet la naissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (341). Ce mécanisme intervient dans certains processus physiologiques comme le développement embryonnaire, la réparation tissulaire ou encore au cours du cycle menstruel. Il fait intervenir des protéases nécessaires à la dégradation de la membrane basale et de la MEC sous-jacente permettant la pénétration des cellules endothéliales et donc la formation de nouveaux vaisseaux. Parmi ces protéases, la CathS intervient en dégradant le collagène IV et l'élastine. Dans un modèle *in vivo* de réparation tissulaire, la délétion de la CathS est corrélée avec une diminution de nouveaux vaisseaux sanguins. Ces cellules endothéliales déficientes en CathS montrent un potentiel invasif fortement diminué puisqu'elles ne dégradent plus aussi efficacement les protéines environnantes (342).

5.1.5. Rôle dans le remodelage matriciel

Historiquement, les principales protéases qui ont été décrites dans la dégradation de la MEC sont les MMPs. Elles possèdent de nombreuses propriétés qui en font d'excellentes candidates pour remplir ce rôle. En effet, elles sont localisées soit à la membrane plasmique, soit sécrétées dans le milieu extracellulaire et leur activation optimale se fait à pH neutre. De plus, elles présentent des caractéristiques structurales leur permettant d'interagir avec les protéines matricielles telles que les collagènes ou l'élastine (343). Cependant, diverses études semblent réfuter le rôle central des MMPs dans la dégradation de la MEC suggérant l'existence d'autres protéases. L'utilisation d'inhibiteurs de cathepsine à cystéine tels que le E64 montrent que cette famille d'enzyme peut jouer un rôle important dans le remodelage de la MEC. En effet, les résultats démontrent une inhibition de la dégradation de la matrice osseuse par les ostéoclastes lors du traitement avec le E64 (344). Ce rôle est confirmé par des données *in vivo* qui mettent en évidence une corrélation entre l'inhibition de l'activité des cathepsines et une diminution de la dégradation de protéines matricielles. En effet, un modèle murin d'anévrisme aortique présentant une délétion de la CathS montre une augmentation de la présence en collagène au niveau des lésions comparées aux souris contrôles exprimant de la CathS (345). Les mêmes observations ont été constatées pour l'élastine avec l'utilisation d'un modèle murin pro-athérogène associé à une délétion de la CathS (30). Ces observations ont été confirmées *in vitro* avec l'utilisation du LHVS diminuant drastiquement la dégradation de gel d'élastine et de collagène par des CMLs (27,121).

5.2. Implication dans les pathologies cardiovasculaires

5.2.1. Rôle de la CathS dans l'anévrisme aortique abdominal

L'anévrisme aortique abdominal est une pathologie cardiovasculaire caractérisée par une dilatation de l'aorte abdominale dont le diamètre peut atteindre jusqu'à 3 cm ce qui représente une augmentation de plus de 50 % par rapport au diamètre normale de l'aorte (346). Des études sur l'animal ont été menées afin de comprendre l'implication de la CathS dans cette pathologie. Pour cela, un modèle murin d'anévrisme aortique a été mis au point avec la mise en place de pompe osmotique contenant de l'angiotensine II induisant une dilatation aortique sévère après 1 mois de traitement (347). L'utilisation de ce modèle chez des souris ApoE^{-/-}/CathS^{-/-} a montré que la délétion de la CathS inhibe la formation d'anévrismes aortiques induit

par l'angiotensine II (345). Cette étude montre que cette protéase est impliquée dans les mécanismes intervenant au cours de la protéolyse matricielle, de l'angiogenèse, de l'apoptose et de la réponse inflammatoire associées à cette maladie. En effet, la délétion de la CathS limite l'apoptose des CMLs aortiques. Ces données ont été confirmées par la littérature montrant qu'une délétion de la CathS diminue l'apoptose des cellules épithéliales induit par l'IFN- γ dans un modèle murin d'emphysème. En parallèle de ces résultats, il a aussi été démontré que la CathS facilite la néovascularisation qui est un processus associé à la rupture des lésions anévrismales. Ces observations sont également corrélées aux données de la littérature montrant que des cellules endothéliales traitées avec un inhibiteur de CathS perdent la capacité à former des microtubules (342). Enfin, une étude clinique utilisant du plasma de patients atteints de cette pathologie a montré une augmentation significative de l'expression de la forme active et proenzyme de la CathS. Les résultats ont, également, mis en évidence une corrélation positive entre l'expression de la CathS et le diamètre de l'anévrisme (348).

5.2.2. Rôle de la CathS au cours de l'IRC : implication dans le développement de l'athérosclérose et les calcifications vasculaires

Une étude clinique menée sur des artères coronaires et carotidiennes provenant de biopsies de patients atteints d'IRC ont montré une absence de CathS dans des lésions non athéromateuses alors que celle-ci est retrouvée dans les plaques d'athérosclérose au niveau des cellules spumeuses de l'intima, des CMLs, ainsi que des macrophages situés dans la média. Ce marquage a été confirmé par une étude transcriptomique effectuée sur les extraits d'aorte. Ainsi, ces données suggèrent que la CathS pourrait intervenir dans le développement des plaques d'athéromes (27). De plus, *via* l'utilisation d'un modèle murin pro-athérogène, Sukhova et *al* (232) ont montré que la CathS est impliquée dans l'expression de molécules d'adhésion, VCAM-1 et MCP-1, au cours de la phase d'initiation de l'athérosclérose lors de l'étape du recrutement des monocytes circulants. De plus, cette étude a montré qu'elle joue un rôle dans la transmigration leucocytaire par son implication dans la dégradation de la membrane sous-endothéliale. Lors de la progression des plaques d'athérosclérose, ces auteurs ont, de plus, établi une corrélation entre la dégradation des fibres élastiques permettant la migration des CMLs vers l'intima et l'absence d'expression de la CathS (232). Enfin, des études cliniques et *in vivo* ont observé une corrélation négative entre le taux sérique de la CathS et le taux de filtration

glomérulaire mesuré chez un modèle murin d'IRC ou calculé chez des patients urémiques (349). Cela accentue le propos selon lequel la CathS pourrait être un biomarqueur de l'IRC. Ainsi, l'implication dans cette pathologie de cette cystéine protéase a été étudiée plus avant. Des modèles murins ApoE^{-/-} urémiques soit dénués de CathS, soit dans lesquelles son activité est bloquée par un inhibiteur spécifique le RO5444101, ont permis de mettre en lumière les différents mécanismes dépendant de cette protéase (350). Premièrement, en ce qui concerne la composant inflammatoire, la délétion ou l'inhibition pharmacologique de la CathS entraîne une diminution des macrophages au niveau des valves cardiaques et des plaques d'athérosclérose. De plus, le marqueur d'activation des macrophages, GDF15, est fortement diminué dans les crosse aortiques. D'autre part, l'absence d'activité ou d'expression de la CathS cause une diminution importante de la taille des plaques d'athérosclérose localisées dans les crosse aortiques. De plus, il a été mis en évidence que la délétion ou l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la CathS induisent une réduction de la dégradation des fibres élastiques. Enfin, les calcifications vasculaires, visualisées *in vivo* à l'aide d'une sonde fluorescente associée à une coloration Von Kossa au niveau des valves cardiaques, sont diminuées de façon significative lorsque la CathS n'est plus exprimée ou lorsque son activité protéolytique est inhibée. Afin de valider ces observations concernant les calcifications, les variations d'expression des marqueurs ostéogéniques (ostéopontine, ostéocalcine, ostéoprotégérine, phosphatase alcaline) ont été étudiées dans ces différents modèles. Ainsi il a été constaté une réduction de l'expression de ces divers marqueurs au niveau de la média et de l'intima dans les modèles ne présentant plus de CathS ou exprimant la CathS dont l'activité enzymatique est inhibée (30,175). L'ensemble de ces résultats démontre que les complications cardiovasculaires accélérées au cours de l'IRC impliquent l'activation de la CathS mais ces relais moléculaires restent inconnus.

But et Hypothèse

II. But et hypothèse de l'étude

Ce projet de recherche a été mené au sein de l'Unité Mixte de Recherche CNRS / URCA n°7369 " Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire " (MEDyC). Ce travail s'inscrit dans la thématique de recherche de l'équipe 2 " Vieillesse Matricielle et Remodelage Vasculaire " de cette Unité qui étudie l'impact du vieillissement de la MEC dans la survenue de complications vasculaires dans divers contextes physiopathologiques tels que l'IRC.

L'IRC est responsable d'un vieillissement accéléré des vaisseaux sanguins impliquant une amplification des processus intervenant dans l'athérosclérose et les calcifications vasculaires. Ceci est en partie dû à une accumulation de toxines urémiques telles que les AGEs ou des protéines de la famille S100, qui, combinés à l'hyperphosphatémie retrouvée au cours de l'IRC, sont associées au développement accru des processus pathologiques précités. Chez les patients atteints d'IRC, le traitement le plus efficace reste la greffe rénale qui permet de soigner cette insuffisance fonctionnelle, de freiner le développement des complications cardiovasculaires associées, tout en garantissant une bonne qualité de vie aux malades. Cependant, les patients sont trop nombreux comparé au nombre de greffons disponibles. Il devient donc urgent aujourd'hui de comprendre les mécanismes impliqués dans les complications observées au cours de l'IRC, particulièrement les calcifications vasculaires, ce qui permettra l'identification de cibles thérapeutiques innovantes afin de traiter les patients plus efficacement.

Dans ce cadre, au cours de l'IRC, il a été observé une dégradation élevée des fibres élastiques (174). Cette élastolyse pourrait être la conséquence de l'expression accrue d'élastases telles que les MMP-2 (351) et MMP-9 (352) qui ont été largement étudiées au cours de pathologies vasculaires. Cependant une autre famille d'élastases, les cathepsines, et plus particulièrement la cathepsine S, pourrait jouer un rôle crucial. De manière intéressante, au cours de l'IRC, son taux sérique augmente au fur et à mesure que le DFG diminue (349). De plus, son expression a été corrélée à une élastolyse importante et au développement des calcifications vasculaires au sein de la média par l'utilisation d'un modèle murin d'urémie (30,175). L'élastolyse observée génère des zones de fracture au niveau de fibres élastiques, contribuant au dépôt de calcium, ce dernier présentant une affinité élevée pour l'élastine fragmentée (353) dû à une augmentation de la polarité de cette dernière (233) (173). Parallèlement à ceci, la dégradation des fibres élastiques libère des EDPs qui pourraient

favoriser la différenciation ostéogénique de CMLs induite par un milieu hyperphosphatémique, phénomène central dans le développement des calcifications (354). Ainsi, les EDPs produits pourraient de ce fait amplifier les processus de calcification observés. Cependant, le lien entre l'expression de CathS, l'élastolyse et la production d'EDPs bioactifs potentiellement procalcifiants n'a pas été étudié à ce jour et aucune donnée *in vivo* n'est disponible pour valider cette hypothèse. De plus, les stimuli responsables de la synthèse de CathS au cours de la vasculopathie urémique reste à ce jour méconnus et dans ce cadre, suite à des données obtenus au laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que le récepteur RAGE pourrait constituer un candidat intéressant.

En effet, au cours de l'urémie, il a été constaté une augmentation de l'expression de RAGE (271,293). Il a de plus été suggéré que ce récepteur ainsi que ses ligands pourraient jouer un rôle important dans le développement des calcifications vasculaires présentes au cours de l'urémie (284,311). Une analyse comparative montre de plus que RAGE est engagé dans des mécanismes communs à ceux décrits pour la CathS. Enfin, il a été montré que ce récepteur induit la production d'INF- γ , un puissant inducteur de l'expression et de la sécrétion de la CathS par les CMLs (285) (121). Il est ainsi tentant de postuler qu'il puisse être impliqué dans sa production au cours de l'IRC.

L'ensemble de ces données nous permettent ainsi de suggérer l'existence d'un axe RAGE/CathS/EDPs qui serait impliqué dans le développement des calcifications vasculaires au cours de l'IRC. Nous avons ainsi proposé l'hypothèse suivante : au cours de l'urémie, l'accumulation de récepteur RAGE et son activation par des toxines urémiques pourrait augmenter l'expression de la CathS. Celle-ci pourrait entraîner une dégradation accrue des fibres élastiques libérant des EDPs, qui pour certains seraient bioactifs. Ces EDPs combinés à l'hyperphosphatémie pourraient alors induire la différenciation des CMLs en cellules " *osteoblast-like cells* " via le complexe récepteur de l'élastine. Ce processus intensifierait la mise en place des calcifications vasculaires, responsables de la rigidité artérielle et des complications cardiaques observées au cours de l'IRC. L'étude de cet axe pourrait ainsi permettre d'identifier les EDPs et le complexe récepteur de l'élastine comme de nouvelles cibles thérapeutiques dans le cadre de la lutte contre les calcifications vasculaires associées à l'IRC.

Afin de répondre à l'hypothèse posée, le présent travail a été découpé en 3 parties.

Dans une première partie, nous avons étudié au cours de l'IRC la corrélation entre l'expression de RAGE, la survenue de calcifications vasculaires, l'élastolyse et l'expression de la CathS. Pour cela, un modèle *in vivo* de vasculopathie urémique utilisé au sein de notre équipe (271), présentant ou non une expression de RAGE, a été choisi. Cela a permis, d'une part, de confirmer le rôle central de ce récepteur dans les mécanismes de calcifications vasculaires grâce à l'utilisation d'une technique innovante d'imagerie pré-clinique, le tomographe moléculaire de fluorescence (FMT), couplé à des analyses histologiques, la coloration von Kossa. D'autre part, l'implication de RAGE dans le remodelage matriciel observé au cours de l'IRC, et particulièrement l'élastolyse, a également été étudié grâce aux propriétés d'auto-fluorescence de l'élastine. Enfin, nous avons montré le lien entre l'expression de RAGE et l'activité des cathepsines par FMT, ainsi que dans l'expression de la CathS par les CMLs, par immunohistochimie sur coupes histologiques et par stimulation de CMLs en culture par une toxine urémique, la protéine S100A12.

La seconde partie de ce travail nous a permis de préciser l'activité élastolytique de la CathS vis à vis de l'élastine vasculaire avec l'étude des EDPs bioactifs produits et leurs effets sur les calcifications. Afin de répondre à ces questions, des techniques de microscopie électronique à balayage et de spectrométrie de masse ont été utilisées. L'influence des EDPs sur les mécanismes impliqués dans les calcifications vasculaires ont été analysés par diverses méthodes de biochimie et de biologie moléculaire associées à une coloration histologique, le rouge alizarine. L'implication du CRE dans ces mécanismes a également été déterminé par l'utilisation de différents inhibiteurs, visant les sous-unités EBP et Neu-1 du CRE. De plus, des données issues de modélisation moléculaire apportent une vision complémentaire vis-à-vis de la liaison d'EDPs bioactifs issus de l'action de la CathS sur l'EBP mais également sur la capacité de certains de ces peptides à lier le calcium pouvant générer des sites de nucléation de calcification.

La troisième et dernière partie de ce projet a consisté en l'étude de la confirmation *in vivo* de l'influence pro-calcifiante des EDPs issus de l'activité élastolytique de la CathS sur le développement des calcifications vasculaires au cours de l'IRC. Pour cela, nous avons utilisé notre modèle de vasculopathie urémique couplé à de l'imagerie pré-clinique et de l'histologie, en comparant les calcifications présentes chez l'animal lorsque ces derniers ont reçu ou non une injection d'EDPs. Enfin, nous avons évalué l'influence du ciblage pharmacologique *in vivo* du CRE vis-à-vis du développement des calcifications vasculaires par l'utilisation d'un inhibiteur de Neu-1, le Tamiflu®.

Matériels et méthodes

III. Matériels et méthodes

A. La culture cellulaire

1. Le modèle cellulaire : les MOVAS-1

Les CMLs représentent les cellules prédominantes dans la média de la paroi vasculaire dont la fonction est la synthèse et l'organisation de la MEC permettant d'assurer les propriétés mécaniques des vaisseaux sanguins (355). Pour assurer ces différentes fonctions, ces cellules possèdent la capacité de passer d'un état synthétique à un état contractile en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent (356). Dans certaines conditions pathologiques telle que l'hyperphosphatémie, cette plasticité phénotypique conduit à une ostéodifférenciation des CMLs qui deviennent alors des cellules " *osteoblast-like* ". Ce switch phénotypique est une étape clef dans la mise en place des calcifications vasculaires au cours de l'IRC (147). Ces CMLs constitueront donc notre modèle cellulaire principale pour l'étude des peptides d'élastine dans les calcifications vasculaires au cours de l'IRC. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser les MOVAS-1, des CMLs vasculaires aortiques murines transfectées par le rétrovirus SV40 leur conférant une stabilité phénotypique. En effet, au cours des différents passages, les cellules primaires se différencient ce qui peut entraîner des variations de réponses cellulaires. Ainsi, afin de limiter la variabilité des résultats, les cellules primaires doivent être utilisées à des passages très courts. C'est dans ce contexte que les MOVAS-1 représentent une bonne alternative aux cellules primaires issues de l'animal, et il a été démontré qu'elles présentent les mêmes propriétés que les CMLs primaires (357). Ce sont des cellules adhérentes, fusiformes qui sont commercialisée par l'*American Type Culture Collection* (CRL-2797).

1.1. Les conditions de cultures des MOVAS-1

Après chaque décongélation, un contrôle de l'absence de mycoplasme a été réalisé afin de s'assurer de la qualité de nos cellules. La recherche de la présence d'ADN mycoplasmaïque s'effectue par une PCR réalisée sur les surnageants de culture.

Les MOVAS-1 ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ avec du "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM) à 4,5 g/L de glucose supplémenté avec 10% de SVF et 1% de généticine permettant le maintien de la pression de sélection. Elles

ont été passées une fois par une semaine dans une boîte de culture de 75 cm² au nombre de 10⁵ cellules permettant un repiquage hebdomadaire. Les cellules confluentes ont été lavées avec du PBS et incubées pendant 2 min avec de la trypsine 0,25 % à 37°C. Les effets de cette dernière ont été ensuite stoppés par l'ajout de milieu complet diluant la trypsine au 1/10^{ème} puis les cellules ont été centrifugées à 1200 g pendant 10 min à température ambiante. Le culot a été repris dans du milieu complet afin de procéder au comptage cellulaire grâce à une cellule de comptage "KOVA slide" (KOVA International). Ceci permet l'ensemencement des cellules à la concentration voulue pour les entretenir mais aussi pour les différentes expériences avec un changement de milieu tous les 2 jours.

1.2. Le traitement des MOVAS-1

1.2.1. Stimulation des MOVAS-1 avec un ligand de RAGE : le S100A12

L'identification de RAGE comme un acteur primordial dans les calcifications et les processus associés a nécessité l'utilisation d'un ligand, le S100A12. En effet, de nombreuses équipes ont démontré un effet pro-calcifiant de cette protéine lorsqu'elle est exprimée par les CMLs *in vivo* (308). Nous avons obtenu du S100A12 grâce à une collaboration avec le Dr. Günter Fritz dont l'activité de recherche se concentre sur l'étude structurale des mécanismes d'activation de RAGE ainsi que l'analyse des protéines S100. La solution a été préparée à une concentration de 1 µg/µl dans du PBS pour être diluée à 50 µg/ml dans le milieu culture afin de traiter les cellules à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ pendant 48 h sans renouvellement.

1.2.2. Stimulation des MOVAS-1 par des peptides d'élastine synthétiques

Nous avons sélectionné 4 peptides d'élastine (EDPs) possédant tous le motif consensus GxxPG dans leur séquence peptidique leur permettant d'adopter une structure bioactive en coude β de type VIII (195). Ils ont été synthétisés par la société *Genecust* (Luxembourg) dont les séquences sont les suivantes :

- VPGAVPGGVPGGVF (P1)
- GAVPGGVPGGVF (P2)
- GLGPGGFPGIG (P3)
- VKPGKVPGVG (P4)

Les MOVAS-1 ont étéensemencées dans des plaques 6, 12, 24, 48 ou puits avec un volume de 1,5 ml, 1 ml, 500 µl et 300 µl respectivement. Le traitement a été réalisé 24 h après l'ensemencement des cellules, une fois que les cellules ont adhéré. Les peptides ont été repris dans du milieu complet à une concentration de 1 mg/ml pour ensuite être dilués à une concentration de 200 µg/ml (358). Le milieu ainsi que les peptides d'élastine ont été renouvelés toutes les 48 h.

1.2.3. Stimulation avec du Phosphate inorganique (Pi)

Les calcifications vasculaires sont étudiées *in vitro* grâce à l'utilisation d'un milieu procalcifiant composé de phosphate inorganique (Pi) sous forme de Na_2HPO_4 à la concentration de 3 mM (359). Le Pi a été préparé à une concentration de 300 mM dans de l'eau distillée à un pH= 7,2. Cette solution a été diluée dans le milieu de culture à une concentration de 3 mM. Le renouvellement du traitement est réalisé tous les 48 h. La conservation se fait à -20°C sous forme d'aliquots.

1.2.4. Les différents inhibiteurs utilisés

Dans le but de déterminer si les effets induits par les peptides d'élastine sont dus à une activation du CRE par leur fixation sur l'EBP, nous avons utilisé différents inhibiteurs ciblant ce récepteur.

1.2.4.1. Inhibiteurs de Neu-1

Le DANA (2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid) a déjà été identifié par notre équipe comme pouvant bloquer les effets des peptides d'élastine se fixant sur le CRE (202). C'est un inhibiteur chimique compétitif non spécifique des sialidase (*Merck*) bloquant l'activité enzymatique de la sous-unité Neu-1 du CRE (Figure 29). Il a été préparé extemporanément à 50 mM dans du PBS afin d'être dilué à une concentration de 400 µM dans le milieu de culture. Il a été incubé seul sur les MOVAS-1 pendant 30 min à 37°C avant l'ajout du Pi seul (3 mM), avec les EDPs seuls (200µg/ml) ou la combinaison des deux.



Figure 29 : Structure chimique du DANA

1.2.4.2. Inhibiteur de la fixation des EDPs : le chondroïtine sulfate

Le chondroïtine sulfate (*Sigma*) a été décrit dans notre laboratoire comme étant un antagoniste de la liaison des EDPs à l'EBP. Il appartient à la famille des GAGs (Figure 30). Il agit en se fixant sur l'EBP ce qui cause une diminution de l'affinité des EDPs sur l'EBP. Lors des traitements, il a été préparé à 2 mg/ml dans le milieu de culture afin d'être dilué à 200 µg/ml lors des traitements.

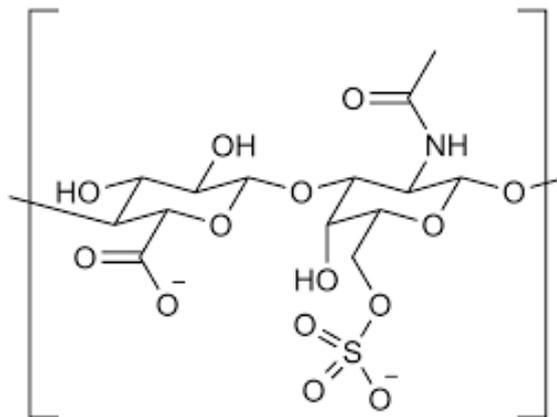


Figure 30 : Structure chimique du Chondroïtine Sulfate

B. Étude de l'activité protéolytique de la CathS sur de l'élastine insoluble et la tropoélastine

1. Digestion de l'élastine insoluble et de la tropoélastine par la cathepsine S

1.1. Purification d'élastine insoluble et obtention de la tropoélastine

1.1.1. Purification de l'élastine insoluble selon la méthode de Schmelzer

Des biopsies d'aorte de 5 mm à 10 mm de long provenant d'aorte bovine ont été utilisées pour isoler l'élastine insoluble par une méthode douce permettant d'éliminer la MEC environnante sans endommager l'élastine. Selon cette méthode adaptée de l'équipe de Daamen *et al*, les biopsies ont été coupées en morceaux de plus petite taille et lavées 2 fois avec une solution composée d'un mélange de chlorure de sodium à 1 M et 0,02 % d'azide de sodium (NaN₃) (p/v) sous agitation pendant 2 h à température ambiante. Ensuite, les échantillons ont été incubés dans une solution composée de 0,02 % de NaN₃ (p/v) et d'éthanol (1 :1, v/v) sur la nuit sous agitation douce. Les échantillons ont été dégraissés dans des bains successifs d'1 h avec différents solvants commençant avec une solution d'éthanol pur suivie par un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1, v/v) puis de l'éther pour terminer avec de l'acétone. Après un dernier lavage avec de l'éthanol pur, l'étape de clivage de la MEC entourant l'élastine insoluble a été réalisée avec 10 % de bromure de cyanogène dans de l'acide formique (97 %, v/v) toute une nuit à température ambiante, sous agitation. Ce bain a été renouvelé pour une incubation de 6 h sous agitation. Le culot a été lavé avec une solution composée de 0,02 % de NaN₃ (p/v) et d'éthanol en respectant un ratio 1 :1 (v/v) sous agitation pendant 10 min. L'extraction de l'élastine a été réalisée à l'aide d'une solution contenant 0,3 M Tris/HCl avec 0,02 % de NaN₃ (p/v), 1,5 M de 2-mercaptoéthanol et 4 M d'urée, sous agitation pendant toute la nuit. Cette solution est renouvelée 2 fois pour une durée de 3h à chaque bain. Un lavage a de nouveau été réalisée avec un mélange contenant 0,02 % de NaN₃, (p/v) et éthanol en respectant un ratio 1 :1 (v/v) sous agitation pendant 10 min. Le culot a été remis en suspension, toute la nuit à 37°C, dans une solution de carbonate d'ammonium (NH₄CO₃) à 100 mM contenant 0,02 % de NaN₃ (p/v) et 8000 unités de trypsine. Ensuite, la réduction des échantillons été réalisée pendant 1 h à l'aide d'une solution composée de 0,3 M de Tris/HCl avec 0,02 % de NaN₃ (p/v), 1,5 M de

2-mercaptoéthanol et 4 M d'urée permettant de stopper l'action de la trypsine. Après 2 bains successifs d'une solution d'acétonitrile (1 : 1 (v/v)) avec 0,1 % d'acide formique (v/v), l'élastine extraite a été lavée de façon consécutive avec un mélange contenant 0,02 % de NaN₃, (p/v) et d'éthanol en respectant un ratio 1 : 1 (v/v) puis avec une solution d'éthanol pur avec un ration de 3:7, sous agitation pendant 10 min pour chaque lavage. Enfin, les échantillons ont été séchés sous un flux laminaire et ont été stockés à -30°C. Cette technique d'extraction a permis d'obtenir des fibres d'élastine proche de celle retrouvées physiologiquement sans microfibrilles.

1.1.2. Purification de l'élastine insoluble selon la technique de Lansing

Cette méthode pour extraire l'élastine insoluble utilise des ligaments larges de nuque de bœuf obtenus auprès de l'abattoir de Rethel (société SOBEVIR). Les ligaments ont été prédécoupés puis conservés à -80°C, température à laquelle le ligament devient rigide. Les morceaux congelés ont été broyés dans un broyeur mécanique à billes métalliques réfrigéré à l'azote liquide. Le broyat a alors été homogénéisé à raison de 100 ml par gramme de tissu broyé pendant 24 h à 4°C sous agitation lente pour extraire les protéines solubles dans une solution de NaCl à 0,15 M contenant du N-éthylmaleimide (NEM) 10 mM, du phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) 2 mM, de l'éthylenediamine tetracetic acid (EDTA) 2 mM et du NaN₃ à 0,02% . La solution a été ensuite centrifugée à 30 000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot a subi ensuite deux autres extractions de 24 h selon la même procédure. Le culot a été lavé au méthanol à raison de 20 ml par gramme de tissu puis centrifugé à 30 000 g pendant 30 min à 4°C. Le broyat a été ensuite délipidé deux fois dans un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1, v/v) pendant 24 h sous agitation lente à 4°C. Après trois lavages au méthanol par centrifugation à 30 000 g pendant 30 min à 4°C, le culot a été asséché par évaporation à température ambiante sous une hôte à flux laminaire jusqu'à ce qu'il soit totalement sec. Ce dernier a été ensuite repris dans de l'eau ultra pure pour éliminer les traces de méthanol résiduelles puis centrifugé à 30 000 g pendant 30 min à 4°C. Le broyat a été hydrolysé trois fois 15 min dans de la soude à 0,1 N chauffée à 98°C puis refroidi dans de la glace entre chaque hydrolyse. Cette méthode permet la dégradation de toutes les protéines insolubles du ligament à l'exception de l'élastine. L'hydrolysate a été alors rincé dans de l'eau ultra pure et le pH est ensuite ajusté à 7. Cette étape a été répétée jusqu'à ce que le pH soit stabilisé à pH 7 lors de la resuspension du culot. À l'issue

de cette étape, l'élastine a été rincée dans du méthanol puis elle subit une seconde délipidation dans un mélange chloroforme/méthanol (2 :1, v/v) pendant 24 h à 4°C sous agitation lente. L'élastine pure a été ensuite rincée au méthanol puis à l'acétone par centrifugation de 30 000 g pendant 30 min à 4°C et mise à sécher sous une hotte à flux laminaire. Ceci nous a permis d'obtenir des fibres d'élastine, de structure semblable aux fibres élastiques natives mais dénuées de microfibrilles.

Le niveau de pureté de l'élastine insoluble obtenue selon ces deux techniques a été analysée par spectrométrie de masse (collaboration C. Schmelzer, Halle, Allemagne)

1.1.3. Obtention de la tropoélastine recombinante

La tropoélastine recombinante utilisée est l'isoforme 2 nommée SHELD26A dont les exons 22, 24A et 26A sont manquants. L'obtention de la tropoélastine a été possible grâce à notre collaboration avec le Dr Christian Schmelzer (Halle, Allemagne).

1.2. Digestion de l'élastine insoluble et de la tropoélastine par la Cathepsine S

L'étude de la capacité de la CathS à dégrader de l'élastine insoluble et de la tropoélastine a été menée en utilisant de la CathS recombinante (*Cathepsin S, Human, Recombinant, E. coli, Merck*). L'activité de chaque lot a au préalable été évaluée à l'aide d'un substrat fluorogénique à la concentration de 0,2 mM (*Cathepsin S Substrate, Fluorogenic, Calbiochem, Merck*) dans un tampon de digestion (0,1 M sodium phosphate buffer (pH 7,4), 2 mM DTT) pendant 1 h à 37°C. La réaction est stoppée en y ajoutant 0,5% d'acide trichloracétique et la fluorescence est mesurée ($\lambda_{em}340$ nm/ $\lambda_{em}405$ nm) en utilisant un lecteur de microplaques spectrofluorimètre Infinite® F200 Pro couplé au logiciel Magellan (*TECAN*).

L'activité enzymatique étant validée, l'activité élastolytique a été testée avec de la tropoélastine ainsi qu'avec les deux types d'élastine obtenues selon les méthodes décrites précédemment. En s'appuyant sur les données bibliographiques, nous avons choisi un rapport de 1/200^{ème} concernant le rapport enzyme/substrat pour la tropoélastine. En ce qui concerne l'élastine insoluble, la ratio utilisé a été de 1:20 (183). L'ensemble des digestions des différents types d'élastine et de la tropoélastine s'effectue à 37°C pendant 8 h ou 24 h sous agitation douce. L'arrêt de la réaction se fait par ajout de 0,5 % d'acide trichloracétique dans le milieu

réactionnel. Après une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à 4°C, dans le cadre de l'élastine insoluble, le culot restant a été récupéré puis conservé à -80°C pour être analysé, plus tard, au microscope électronique à balayage. Le tampon de digestion, dans les deux cas (élastine insoluble et tropoélastine) a été transféré dans un tube et conservée à -80°C pour une analyse en spectrométrie de masse des EDPs produits.

2. Analyse de l'activité élastolytique de la cathepsine S

2.1. Analyse par microscopie électronique à balayage de l'influence de la cathepsine S sur l'organisation ultrastructurale de l'élastine purifiée

Pour cette approche, les différents types d'élastine insoluble, récupérés après digestion, ont été séchés à 37°C pendant 24 h. Les échantillons ont été alors imagés à l'aide d'un microscope électronique à balayage (*JEOL JSM-5400 LV*), disponible sur la plateforme d'imagerie PICT de l'université. Avant cela, une fine couche (10 nm environ) d'or/palladium a été pulvérisée grâce à un évaporateur cathodique JFC 1100 (*JEOL*), pendant 10 min sous une tension de 1,2 kV avec un ampérage de 8 mA. Le microscope électronique à balayage équipé d'une pointe LaB6 a été utilisé en mode imagerie des électrons secondaires. En utilisant un faisceau d'énergie primaire de 20 kV, il a été ainsi possible d'accéder à un grossissement de 2000 fois afin de distinguer les fibres d'élastine de nos différents échantillons. Cette technologie nous a permis d'apprécier une possible modification structurale de l'élastine insoluble après son contact avec de la CathS.

2.2. Étude par spectrométrie de masse des peptides d'élastine produits au cours de la digestion

Les hydrolysats obtenus après l'action de la CathS ont été lyophilisés afin de pouvoir être analysé par LC-MS (collaboration C. Schmelzer, Halle, Allemagne). Les peptides produits ont été séparés par le système chromatographique Ultimate 3000 RSLCnano (*Thermo Fisher Scientific*) couplé à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion Tribrid (*Thermo Fisher Scientific*) équipé d'une source d'ions flex Nanospray. Les peptides ont ensuite été piégés sur colonne (Acclaim PepMap RP-C18, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å) et lavés avec une solution aqueuse contenant 0,1 % d'acide trifluoroacétique pendant 15 min à une vitesse de 30 µL min⁻¹

¹. Ils ont ensuite été séparés sur une colonne en phase inverse (Acclaim PepMap RP-C18, 75 μm x 250 mm, 2 μm , 100 \AA) avec un débit de la phase mobile de 300 $\mu\text{l min}^{-1}$ selon le gradient d'élution suivant : de 1 % à 35 % de solvant B (acétonitrile contenant 0,1 % d'acide formique) pendant 90 min puis de 35 % à 85 % pendant 5 min et enfin 85 % de ce solvant pendant 5 min. Le solvant A est constitué d'eau avec 0,1% d'acide formique. L'acquisition des données a été réalisée en utilisant le mode MS / MS. Chaque scan complet en haute résolution dans l'Orbitrap (m/z 200 à 1500, $R = 120\,000$) a été suivi par des analyses haute résolution des ions produits dans l'Orbitrap (mode HCD avec 27% d'énergie de collision normalisée, $R = 15\,000$), en commençant par le signal le plus intense du spectre de masse. L'exclusion dynamique a permis d'analyser les ions les moins abondants. L'acquisition des données a été réalisée avec le logiciel Xcalibur 3.0.63 (*Thermo Fisher Scientific*). Les données brutes ont été affinées et analysées en utilisant le logiciel PEAKS 7.5 (*Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON, Canada*). La tolérance sur l'erreur de masse pour les ions précurseurs et fragmentés a été fixée à 3,0 ppm et 0,015 Da, respectivement. La base de données de la sous-section bovine d'UNIPROT a été utilisée afin de caractériser les peptides issus de l'élastolyse catalysée par la CathS. Enfin, l'oxydation des résidus prolyls a été considérée comme une modification variable

C. Étude de la différenciation ostéogénique

1. Étude des calcifications *in vitro*

1.1. Mise en évidence des calcifications par la coloration au rouge alizarine

Les MOVAS-1 ont étéensemencées dans une plaque 48 puits à raison de 5×10^4 cellules/puits. Après 24 h, elles ont été traitées avec du Pi à 3 mM, avec les EDPs seuls à 200 $\mu\text{g/ml}$, ou la combinaison des deux. Après 7 jours, les traitements ont été arrêtés puis une coloration au rouge alizarine a été réalisée afin d'observer les calcifications. Pour cela, les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS et fixées pendant 20 min avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4%. Après 3 lavages au PBS, les cellules ont incubées avec du rouge alizarine (64,8 mM à pH = 4,2 dans de l'eau distillée). La coloration a été effectuée sous agitation douce à température ambiante pendant 15 min. L'excès de colorant a été enlevé par différents lavages de la plaque avec de l'eau distillé jusqu'à disparition de toutes traces dans la condition contrôle négatif (milieu complet seul). Les puits séchés ont été pris en photo grâce à une loupe

binoculaire et la quantification de la coloration dans chaque puit a été réalisée grâce à un sous-programme utilisable sur le logiciel ImageJ, macro mise au point par le Dr Terryn (responsable du Plateau technique en Imagerie Cellulaire et Tissulaire de l'URCA).

1.2. Analyse de l'expression de marqueurs ostéogéniques

1.2.1. Étude protéique

1.2.1.1. Extraction des protéines

Les MOVAS-1 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 30×10^3 cellules/puits et traitées pendant 7 jours avec du Pi seul à 3 mM, EDPs seuls à 200 $\mu\text{g/ml}$ ou la combinaison des deux. Après 7 jours de traitement, les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS glacé puis immédiatement lysées à l'aide d'un tampon RIPA (100 mM Tris, pH = 7,5 ; 750 mM de NaCl ; 5 % de Triton X-100 ; 5 % de sodium désoxycholate (v/v) ; 0,5 % sodium dodecyl sulfate (SDS, v/v) comprenant un mélange d'inhibiteur de protéase (Sigma) dilué au $1/1000^{\text{ème}}$ associé à du fluorure de PMSF (Sigma) dilué au $1/100^{\text{ème}}$. Les cellules ont été décollées de la plaque 6 puits par grattage dans le tampon lyse sur glace puis les extraits protéiques sont soumis à une sonication de 2 fois 20 sec dans de la glace. Ensuite, les cellules non lysées ont été éliminées par une centrifugation 10 min à 600 g et les surnageants récupérés ont été placés sur roue pendant 3 h afin d'optimiser l'extraction protéique. Enfin, le matériel insoluble a été éliminé par une centrifugation à 20000 g pendant 45 min et les surnageants ont alors été transférés dans un autre tube et stockés à -20°C .

1.2.1.2. Analyse par western blot

La quantité de protéines présente dans chaque échantillon a été déterminée à l'aide d'un dosage BCA (*BiCinchoninic acid Assay*, *BioRad*) afin de déposer la même quantité pour chaque condition. Les échantillons ont été dilués dans du tampon échantillon 5X (0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,5 % bleu de bromophénol (p/v), 10 % de SDS (p/v), 20 % saccharose (p/v), 25 % β -mercaptoéthanol (v/v) et chauffés à 100°C pendant 10 min avant d'être analysés par SDS-PAGE à l'aide d'un gel 12 %. La migration a été effectuée sous une tension constante de 80 V dans un tampon de migration (25 mM de Tris pH 8,3, 192 mM de glycine, 0,1 % de SDS (p/v)). Les protéines ont été ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert Bio-Rad (Marne-la-Vallée, France). Le transfert a été réalisé dans un

tampon de transfert (20 mM de Tris, 150 mM de glycine, 10% d'éthanol pur (v/v)) pendant 1h30 min à 4°C sous une tension constante de 70 V. L'efficacité du transfert a été vérifiée en visualisant les protéines par coloration de la membrane pendant 5 min avec une solution de rouge ponceau S à 0,2 % (p/v) dans de l'acide trichloroacétique 3 % (p/v) dilué dans de l'eau distillée. La membrane a été ensuite saturée pendant 1h à température ambiante dans une solution de blocage composée de 5 % (p/v) de lait non gras dilué dans du *Tris buffered saline-Tween* (TBS-T, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,1 % Tween 20 (v/v)). Les anticorps anti-SM22 α (*Abcam*, dilution 1/500) et anti-RunX2 (*Cell Signaling Technology*, dilution 1/500) ont été incubés toute la nuit à 4°C sous agitation dans la solution de blocage. Le lendemain, après 5 lavages de 5 min au TBS-T, la membrane a été incubée 1 h à température ambiante et à l'obscurité avec un anticorps secondaire, couplé à la peroxydase ou à un fluorochrome émettant dans l'infrarouge à 800 nm, dilués dans du lait à 5 % (p/v) avec du TBS-T. Après 5 lavages de 5 min au TBS-T, suivi d'un lavage de 10 min au *Tris Buffered Saline* (TBS) (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl), SM22 α et RunX2 ont été révélés par chimiluminescence (*kit ECL prime, Millipore, GE Healthcare, Orsay, France*). Afin de vérifier l'égalité des dépôts protéiques, l'anticorps secondaire permettant l'identification de la β -actine est couplé à un fluorochrome pour une révélation directe par détection de la fluorescence. Ceci a permis pour une même membrane de révéler la β -actine en même temps que la protéine d'intérêt grâce au système d'imagerie Odyssey (*LI-COR, Allemagne*).

1.2.2. Étude de l'expression des ARN messager (ARNm)

1.2.2.1. Extraction des ARNs

L'évaluation du rôle des EDPs sur la différenciation ostéogénique a également été réalisé au niveau transcriptomique. Ainsi, les MOVAS-1 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 30×10^3 cellules/puits et traitées de la même manière que pour l'étude protéique. Après 7 jours de traitement, les surnageants ont été éliminés et 500 μ L de Trizol ont été ajouté dans chaque puit afin d'extraire les ARNs des cellules. Le tapis cellulaire a été lysé par aspiration/refoulement du Trizol jusqu'à ce que l'aspect visqueux disparaisse pour laisser place à une solution plus liquide. Les tubes ont été vortexés très fortement pendant 2 à 3 min et ont été ensuite incubés 5 min à température ambiante, puis 100 μ l d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (IAA) (24 :1, v/v) ont été ajoutés. Après une agitation vigoureuse, une incubation de 3 min a été réalisée à température ambiante suivie d'une centrifugation (12 000

g, 4°C, 15 min). Cette étape a permis de séparer les protéines, les acides désoxyribonucléiques (ADNs) et les acides ribonucléiques (ARNs) en trois phases distinctes. La phase aqueuse supérieure contenant les ARNs est récupérée très délicatement et transférée dans un tube de 1,5 ml puis 200 µl d'isopropanol ont été ajoutés. Après avoir incubé les tubes 10 min à température ambiante, ils ont été centrifugés (12 000 g, 4°C, 10 min) permettant la précipitation des ARNs sous forme de pelote. Les surnageants ont été éliminés et les culots d'ARNs ont été lavés dans 1 ml d'éthanol 75% puis centrifugés (7500 g, 4°C, 5 min). Les surnageants ont été éliminés et les culots d'ARNs ont été séchés complètement à température ambiante, puis repris dans 20 µl d'eau ultra pure et conservés à -80°C.

1.2.2.2. Dosage et vérification des ARNs

Après extraction, les ARNs ont été dosés par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm à l'aide d'un Nanodrop (*ThermoScientific*). Pour ce faire, 2 µl d'eau ultra pure ont été utilisés pour calibrer l'appareil puis 1 µl d'échantillon a été déposé sur le lecteur afin de déterminer la concentration en ARN et de détecter d'éventuelles contaminations. Les ARNs ont par la suite été remis à une concentration de 100 ng/µl et leur qualité a été vérifiée par analyse sur gel d'agarose 1% (p/v) contenant 0,0025% de bromure d'éthidium (BET, v/v). Après avoir vérifié l'absence de bande contaminante du type ADN génomique et la non-dégradation des ARNs, ils ont été conservés à -80°C.

1.2.2.3. Rétrotranscription des ARNs et PCR de vérification

Cette étape de transcription inverse ou également appelé rétrotranscription consiste à transcrire de façon inverse les ARNm and ADN complémentaire (ADNc) grâce à une enzyme la rétrotranscriptase. Pour cette étape, les ARNs ont été rétrotranscrits en ADNc à l'aide d'un kit appelé " *Verso cDNA Kit* " (*ThermoScientific*) et pour chaque échantillon, 250 ng d'ARN (2,5 µl) ont été rétrotranscrits dans un mélange contenant 1X du tampon cDNA synthesis 10X, 0,5 mM de dNTP, d'oligodT, d'hexamères, d'enzyme VERSO mix, de RT-enhancer et complété à 20 µl avec de l'eau ultrapure dépourvue d'ARNase. La rétrotranscription a été effectuée dans un thermocycleur (*BioRad*) selon le programme suivant : 42°C pendant 30 min puis 2 min à 95°C.

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*), technique utilisée couramment dans la biologie moléculaire, a été mise au point par Kary Mullis (Mullins et al., 1992). Elle permet l'amplification génique d'une séquence d'ADNc permettant de produire spécifiquement des copies d'un ADNc. Cette technique exploitant le processus de réplication se réalise grâce l'action d'une enzyme, l'ADN polymérase, qui synthétise un brin complémentaire d'un ADNc servant de matrice. L'initiation de cette phase se fait grâce à l'hybridation, de part et d'autre de l'ADNc, d'amorces sens et anti-sens composées d'une vingtaine de bases spécifiques. Cette configuration permet à l'ADN polymérase de répliquer l'ADNc afin d'en obtenir de nombreuses copies. Cette réaction comporte plusieurs étapes répétées n fois (Figure 31) :

- ⇒ **La dénaturation** : elle s'effectue à 95°C permettant la rupture des liaisons d'hydrogène et donc la séparation des 2 brins de l'ADN. L'ADN passe sous forme simple brin dans le milieu.
- ⇒ **Hybridation** : le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune complémentaire d'un des 2 brins. La température permettant la fixation des amorces sur les monobrans d'ADN est dépendante de la température d'hybridation des amorces utilisées (T_m). Les amorces en large excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent leur séquence complémentaire.
- ⇒ **Élongation** : cette phase s'effectue à 72°C permettant à la Taq polymérase l'allongement des amorces par incorporation des bases nucléiques complémentaires de la matrice auquel elles sont hybridées grâce à l'ADN polymérase.

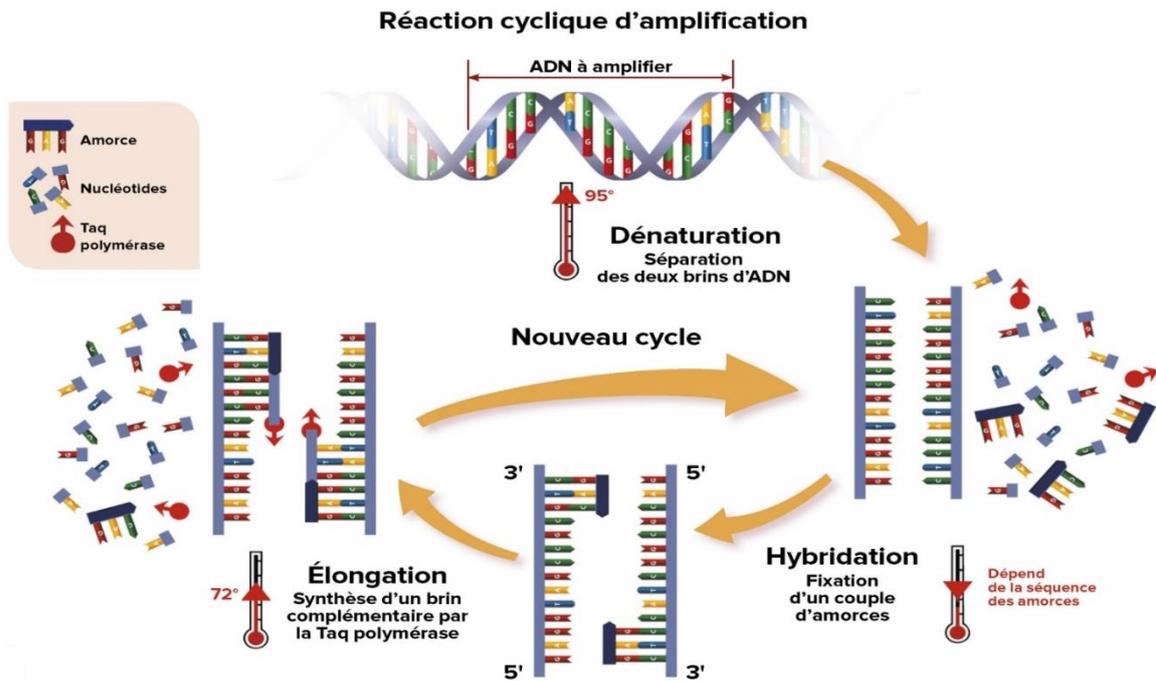


Figure 31 : Schéma d'un cycle d'amplification de PCR. Un cycle de PCR est constitué de trois étapes phares : la dénaturation, l'hybridation, des amorces puis l'élongation des amorces formant ainsi au premier cycle deux ADN double brin identiques entre eux et l'ADNc matrice. Le second cycle est constitué des mêmes étapes donnant cette fois quatre ADN double brin identiques. Le concept de la PCR est ainsi l'amplification d'un ADN permettant après n cycles d'être détectable.

Cette étape d'amplification produit une quantité de produit PCR proportionnelle à la quantité de départ d'ADNc directement associée à la quantité d'ARNm présent initialement dans les échantillons après dosage. Afin de vérifier la rétrotranscription des ARNm, une PCR ciblant le gène de l'actine a été réalisée selon le protocole suivant. Un mix a été préparé pour la réaction de PCR contenant pour 1 réaction : 0,5 μ l d'ADNc additionnés à 1X de tampon 10X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP, 0,4 μ M d'amorces sens et anti-sens, 0,1 μ l de l'enzyme *Taq* polymérase, complétés à 25 μ l avec de l'eau ultra-pure. La PCR est réalisée dans un thermocycleur (*BioRad*) selon le programme suivant : *i*) 94°C pendant 3 min permettant l'activation de l'enzyme *Taq* polymérase ; *ii*) dénaturation des brins d'ADNc à 94°C pendant 30 s ; *iii*) hybridation à 60°C pendant 30 s, température correspondant aux T_m des amorces ; *iv*) élongation à 72°C pendant 30 s. Ces trois dernières étapes ont été répétées 30 fois puis la PCR se finit par une étape d'élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits de PCR ont été ensuite vérifiés et analysés par migration sur gel d'agarose 1% contenant 0,0025% de BET.

1.2.2.4. qPCR

La PCR en temps réel encore appelée PCR quantitative ou qPCR utilise le principe de base de la PCR classique avec pour différence que l'amplification est mesurée tout au long de la réaction. Dans une qPCR, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent, ici le SYBR Green, dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité de produits PCR néo-formés. Le SYBR Green est un agent intercalant qui émet un signal lorsqu'il se fixe dans le petit sillon de l'ADN double brin créé après les étapes d'hybridation et d'élongation d'une amorce, ceci sans affecter la réaction de PCR. Cette méthode permet d'obtenir une cinétique de la réaction de PCR et ainsi de quantifier l'ADNc de départ par détection de la fluorescence. Au cours d'une réaction de qPCR, il existe une proportionnalité pendant la phase exponentielle correspondant au début du moment où le signal est supérieur au bruit de fond. Durant cette phase, plus la cible initiale est présente en quantité importante moins il y aura besoin de cycles d'amplification (appelé Ct, *threshold cycle*) pour que la fluorescence soit détectée à une valeur seuil définie. Ce seuil est déterminé arbitrairement par l'utilisateur et correspond à un niveau de fluorescence suffisamment bas, mais supérieur au bruit de fond, pour que les courbes d'amplification soient dans la phase exponentielle d'amplification permettant ainsi la quantification au sein de l'échantillon en fonction de la valeur prise par Ct. Généralement cette valeur seuil est placée au centre de la courbe dans la phase exponentielle.

Les amorces des gènes d'intérêt et des gènes de référence utilisés dans cette étude ont été synthétisées par Eurogentec (Belgique). Elles sont référencées dans le tableau 2. Les amorces sont conçues de telle manière que la température d'hybridation soit la même pour toutes (60°C). Pour chaque gène un " blanc " (ADNc remplacé par de l'eau ultra-pure) a été réalisé pour vérifier l'absence d'amplification aspécifique. De plus, l'expression des gènes d'intérêt a été normalisée par rapport à deux gènes de références murins, 36B4 et RPS26, dont l'expression génique évolue peu ou pas. Le volume réactionnel final est de 15 µl, contenant 5 µl d'ADNc dilué au 1/10^{ème} dans de l'eau ultra-pure, 7,5 µl de SYBR Green, 1,1 µl d'amorces sens et anti-sens à 3 µM et 1,4 µl d'eau ultra-pure. Chaque cycle de PCR est constitué d'une étape d'activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 15 min suivie de 40 cycles de 10 s à 95°C (dénaturation) puis 1 min à 60°C (hybridation, élongation). La qPCR a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur.

Les données ont été analysées par le logiciel CFX manager (Biorad) et ont été présentées en $1/\Delta Ct$, c'est-à-dire en expression relative par rapport à un des gènes de ménage selon la

formule suivante : $1 / (\text{moyenne des Ct du gène d'intérêt} - \text{moyenne des Ct du gène de ménage 36B4})$. Le gène de ménage 36B4 a été choisi pour toutes les analyses de l'étude car il présente l'avantage d'avoir une expression plus stable que celle de RPS26.

Amorce		Séquence	Taille de l'amplikon
Ostéopontine	Sens	5' - CGTCCCTACAGTCGATGTCC-3'	91 bp
	Anti-sens	5' - GGACTCCTTAGACTCACCGC-3'	
36B4	Sens	5' - AGATTCCGGGATATGCTGTTGG-3'	133 bp
	Anti-sens	5' - AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC-3'	
RPS26	Sens	5' - TAGAAGCCGCTGCTGTCAGG-3'	101 bp
	Anti-sens	5' - AGATTCCGGGATATGCTGTTGG-3'	

Tableau 2 : Les différentes amorces utilisées pour la qPCR

2. Mise au point d'un modèle *ex vivo* d'anneaux aortiques

Le rôle des peptides d'élastine dans les processus de calcifications vasculaire a également été étudié avec un modèle plus complexe que le modèle *in vitro*. Ceci a nécessité la mise au point d'un modèle *ex vivo*. Pour cela, des souris C57bl/6 de 8 semaines ont été euthanasiées à l'aide d'une surdose de dioxyde de carbone afin de récupérer les aortes thoraciques. Une désinfection de la partie abdominale a été par la suite réalisée grâce à l'utilisation d'éthanol 70 % permettant d'effectuer une laparotomie dans les meilleures conditions. Un nettoyage du système vasculaire a ensuite été réalisé par l'injection de PBS à l'aide de l'introduction d'une aiguille de 23G dans l'apex du cœur vers le ventricule gauche. Les organes ont été extraits permettant un accès total à l'aorte thoracique. À l'aide d'outils de microdissection, l'aorte thoracique a été prélevée et placée dans du PBS à 37°C contenant 1 % d'antibiotique afin d'enlever l'adventice puis de la couper en anneaux aortiques de 2 à 3 mm. Ces derniers ont été transférés dans une plaque 48 puits à raison d'un anneau par puits contenant du DMEM (1 g/l de glucose) complété d'1 % d'antibiotique (streptomycine/pénicilline, v/v). Après 2 jours, les anneaux aortiques ont été traités avec du Pi (3 mM) seul, les EDPs (200 µg/ml) ou la combinaison des deux. Après 5 jours, les anneaux aortiques ont été lavés dans 2 bains de "Hanks' Balanced Salt solution" (HBSS), puis fixés dans du formol pendant 24 h. Les anneaux ont été ensuite inclus dans de la paraffine. Les calcifications ont été recherchées à l'aide de la coloration Von Kossa. Pour cela, les anneaux ont été coupés avec une épaisseur de 3 µm et hydratés dans de l'eau après l'étape de déparaffinage. Les coupes ont été incubées avec 1 % de nitrate d'argent (Merck) dans un bocal de Coplin transparent placé sous une lumière UV

pendant 25 min, puis rincées de nombreuses fois à l'eau distillée. L'excès de nitrate d'argent non spécifique a été éliminé grâce à une incubation de 5 min dans une solution contenant 5 % de thiosulfate de sodium (*Merck*), puis par plusieurs lavages à l'eau distillée. Enfin une contre coloration a été réalisée avec une solution de Rouge Nucléaire pendant 5 min suivi de plusieurs rinçage à l'eau distillée. Pour finir, les coupes ont été déshydratées par de l'alcool gradué et absolu puis plongées dans du xylène permettant le montage entre lame et lamelle utilisant de l'Eukitt (*Kindler Gmbtt*).

D. Analyse de l'expression de la Cathepsine S

Afin d'évaluer si l'activation de RAGE et les EDPs sont impliqués dans l'expression de la CathS, une étude par immunofluorescence a été menée. Les CMLs (10×10^3 cellules/puits) ont étéensemencées en plaque 24 puits sur des lamelles en verre préalablement recouverte avec de la gélatine 1 %. Après 24h, les cellules ont été traitées pendant 48 h avec du Pi seul (3 mM), des EDPs seuls (200 µg/ml), la combinaison des deux ou encore avec du S100A12. Un lavage doux au PBS a ensuite été réalisé avant de fixer les cellules avec du PFA 4% pendant 20 min à température ambiante. Après 2 lavages doux au PBS, la saturation des sites aspécifiques a été réalisée avec une solution de BSA 3 % dans du PBS, pendant 1 h à température ambiante. L'anticorps anti-Cathepsin S (Santa Cruz, dilution 1/50^{ème}) a été incubé sur les lamelles pendant toute une nuit à 4°C dans une solution de BSA 1% en chambre humide. Le jour suivant, les lamelles ont été lavées au PBS 5 à 6 fois grâce à l'utilisation d'un papier absorbant permettant de réaliser un lavage doux par capillarité. L'anticorps secondaire (*Alexa Fluor 568 nm, Abcam*, dilution 1/1000^{ème}) a été incubé sur les lamelles pendant 2 h à température ambiante en chambre humide dans la même solution que l'anticorps primaire. Après une série de lavages doux, les lamelles ont été montées sur lame par l'utilisation d'un milieu de montage contenant du DAPI (*ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI, Invitrogen*) pour la coloration des noyaux des cellules. Enfin, la fluorescence des cellules a été détectée grâce à l'utilisation d'un microscope confocal rapide, AxioObserver (ZEISS).

E. Analyse *in vivo* des complications cardiovasculaires associées à l'IRC et étude des acteurs moléculaires

1. Induction de l'IRC

L'étude du rôle des peptides d'élastine sur les processus de calcification a été également réalisée à l'aide d'un modèle *in vivo*. En effet, en se basant sur les données de la bibliographie, un modèle d'IRC a été mis au point au sein de notre laboratoire par l'utilisation de souris C57BL/6 âgées de 8 semaines présentant une délétion pour l'apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}). Ces souris sont identifiées comme un modèle adapté pour l'étude des calcifications dont les caractéristiques sont proches de celles retrouvées chez l'Homme. Elles présentent une clairance retardée des lipoprotéines et une accumulation de chylomicrons qui entraînent le développement de stries lipidiques associées à des calcifications vasculaires au niveau de l'intima. De plus, l'IRC accélère le développement des calcifications vasculaires médiales (172). L'induction de l'IRC nécessite une anesthésie générale des souris par l'utilisation d'isoflurane (4 % pour l'induction de l'anesthésie et 2 % pour le maintien) avec, en parallèle, une prise en charge de la douleur par l'injection sous cutanée de buprénorphine à raison de 0,1 mg/kg. Après une épilation de la zone chirurgicale, une incision a été réalisée sur le flanc gauche de l'animal permettant de sectionner les deux pôles du rein. Une attention particulière est portée à cette étape pour ne pas enlever une partie trop importante du rein, fatale pour la souris. Les fragments réséqués ont été pesés et un électrocoagulateur a été utilisé pour stopper le saignement après lésion de part et d'autre du rein. Enfin, une suture des plans musculaire et dermique a été réalisée et la souris a été placée sur une table thermorégulée pour un réveil dans des conditions optimales. Après 2 semaines, les souris ont été, de nouveau, anesthésiées avec de l'isoflurane (4 % pour l'induction et 2 % pour le maintien de l'anesthésie) afin de réaliser une néphrectomie du rein controlatéral. De la même manière que précédemment, une ligature de l'artère rénale a été réalisée permettant une extraction du rein sans danger hémorragique puis une suture des différents plans a été effectuée. La prise en charge de la douleur a été effectuée de la même façon à l'aide de buprénorphine (0,1 mg/kg) avant l'opération. Ce groupe représente le groupe IRC dans lequel, après 2 semaines, une IRC est mise en place. Ce groupe est comparé avec le groupe Sham où les souris ont subi les deux interventions chirurgicales au cours desquelles le rein a été seulement délogé de son emplacement. La prise en charge de la douleur a été réalisée de la même façon que pour le groupe IRC. L'apparition de l'urémie est validée après un dosage sérique de l'urée après 17 semaines d'IRC. Ce même modèle de souris IRC a

été appliqué, également, chez des souris double knockout ApoE^{-/-}RAGE^{-/-} (DKO) afin d'étudier le rôle de RAGE dans les calcifications vasculaires au cours de l'IRC (271).

À l'aide de ces modèles, l'activité des cathepsines et la présence des calcifications vasculaires ont été analysées *in vivo* grâce à l'utilisation de la *Fluorescence Molecular Tomography* (FMT) et d'histologie. Les modifications des fibres élastiques ont été étudiées par l'évaluation de l'élastolyse grâce à l'autofluorescence de l'élastine. Enfin, la fonction cardiaque a été explorée *via* la mesure de la fréquence cardiaque et la rigidité artérielle a été évaluée par mesure de la vitesse d'onde de pouls.

2. Inhibition de l'expression de RAGE *in vivo*

L'étude de l'implication de RAGE dans les processus de remodelage vasculaire au cours de l'IRC a nécessité le recours à un modèle présentant une délétion du gène AGER. Pour générer des souris ApoE^{-/-} RAGE^{-/-}, un croisement a été réalisé sur 12 générations entre les deux lignées murines homozygotes. Les souris RAGE^{-/-} ont été générées en utilisant le système Cre/Lox P. Ainsi, les éléments essentiels (exons 2 à 7) du gène AGER ont été flanqués de 2 sites lox P orientés dans le même sens. Un gène rapporteur EGFP dépourvu de promoteur a été ajouté à la construction de même qu'un promoteur TK " *Thymidine Kinase* ". Des cellules embryonnaires E14.1 ont ensuite été transfectées avec cette construction puis les clones positifs ont été injectés dans des blastocytes de souris C57Bl/6. Enfin, les souris obtenues ont été croisées avec des animaux exprimant la Cre dans tous les tissus entraînant la délétion de l'ensemble exon 2 à 7 de RAGE situé entre les sites loxP. Cela permet alors de placer le promoteur au niveau de la EGFP qui s'exprime, signe de réussite de la délétion du récepteur (361).

3. Analyse *in vivo* de l'expression de RAGE

Après les 17 semaines d'IRC, les aortes des souris ont été récupérées et broyées à l'aide de billes dans 500 µl Trizol afin d'extraire les ARNs. Après cette étape, le même protocole que précédemment décrit pour les MOVAS-1 a été appliqué afin d'obtenir les ADNc. La qPCR a également été réalisée de la même façon que précédemment afin de nous permettre d'évaluer

l'expression de RAGE. En parallèle, cette technique nous a permis également de valider la délétion de RAGE dans notre modèle ApoE^{-/-}RAGE^{-/-}.

4. Analyse *in vivo* de l'activité des cathepsines et des calcifications

4.1. La Tomographie moléculaire de fluorescence

L'étude des calcifications et l'activité des cathepsines *in vivo* ont utilisées un système d'imagerie pré-clinique, le FMT 4000 (*Perkin Elmer, France*). Ce système d'imagerie est un tomographe moléculaire de fluorescence permettant de détecter et de quantifier une sonde de façon non invasive chez le petit animal. Pour la reconstruction en 3D de la fluorescence, il est nécessaire d'obtenir un ensemble de données tridimensionnelles, les voxels. Ainsi le FMT 4000 utilise le principe de la trans-illumination avec la source lumineuse (les lasers) située à l'opposé du système de détection obligeant, ainsi, la lumière à traverser tous les tissus de l'animal avant d'être capturée par des détecteurs. Cette configuration donne l'avantage de limiter le bruit de fond d'excitation (Figure 32).

Pour les calcifications, un agent reconnaissant le bisphosphonate (*OsteoSense 680EX*) a été utilisé alors que pour l'activité des cathepsines, c'est une sonde activable par les cathepsines B, L, S et la plasmine (*Prosense 750EX*). Les animaux ont été soumis à un régime sans chlorophylle afin d'éviter la détection des aliments puisque sa longueur d'onde se superposent avec celles des sondes. Les sondes ont été injectées en rétro-orbital à l'aide de seringues à insuline de 1 ml (*Dominique Dutscher*), sous anesthésie, 24 h avant l'imagerie des souris à raison de 2 nmol dans 100 µl pour l'*Osteosense 680EX* et de 4 nmol dans 200 µl pour la *Prosense 750 EX* selon les recommandations du fournisseur. Le lendemain, les souris ont été anesthésiées sous isoflurane (4% pour l'induction et 2% pour le maintien) et épilées, à l'aide d'une crème dépilatoire, au niveau dorsal et ventral de la partie abdominale afin que les poils n'interfèrent pas avec le trajet du laser lors de la trans-illumination. Ensuite, l'animal a été placé dans une cassette d'imagerie au niveau de repères fiduciaires permettant de délimiter la zone d'intérêt qui est traversée par le laser correspondant à la sonde utilisée. Après 20 min d'imagerie, les souris ont été placées sous lampe chauffante pour garantir un réveil optimal. Le suivi des calcifications et de l'activité des cathepsines ont été fait à 17 semaines d'urémie sur l'animal entier suivi d'une mesure de la fluorescence *ex vivo* après dissection de l'ensemble cœur, cross aortique, aorte afin, dans certains cas, de d'affranchir du potentiel bruit de fond.

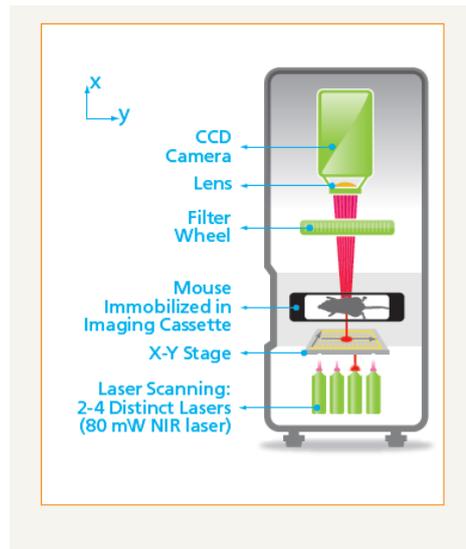


Figure 32 : Schéma de fonctionnement du FMT. Le FMT 4000 utilisant le principe de la trans-illumination. Les lasers traversent l'animal immobilisé dans la cassette d'imagerie avant que le signal soit récupéré par une caméra CDD permettant la conversion des photons issus de la fluorescence en un signal électrique donnant une image.

4.2. Quantification de la fluorescence

Après avoir imagé les souris, le logiciel *TrueQuant*[®] a été utilisé afin de quantifier le signal fluorescence récupéré. Pour cela, une échelle de concentration en nM a été déterminée afin de s'affranchir du bruit de fond. Ensuite, une région d'intérêt, au niveau de l'aorte et du cœur, a été déterminée et a été reproduite avec les mêmes mesures et au même endroit chez tous les individus. De la même manière, une zone de bruit de fond a été définie au niveau d'une partie non fluorescente chez la souris. Après élimination de cette valeur, la concentration en pmol a été calculée dans la zone d'intérêt. Ainsi comme la zone d'intérêt et la zone de bruit de fond sont les mêmes entre les individus, les valeurs de fluorescence ont pu être comparées.

5. Analyses immunohistochimiques

Les souris ont été sacrifiées après 17 semaines d'urémie par une rupture des vertèbres cervicales sous anesthésie gazeuse à l'aide d'isoflurane. Après une laparotomie, l'ensemble des organes sont nettoyés par un rinçage intra-cardiaque de PBS permettant de chasser le sang dans le système vasculaire. Les organes autour de l'aorte (foie, intestin, estomac, reins, vessie, organes génitaux etc...), ont été ensuite éliminés permettant l'accès à l'aorte. À l'aide de ciseaux de microdissection, l'aorte ainsi que la crosse aortique ont été nettoyées du tissu conjonctif

environnant permettant de prélever la crosse aortique, l'aorte thoracique et l'aorte abdominale. L'aorte thoracique a été placée dans un liquide appelé *Optimal Cutting Temperature (OCT) (CellPath)* qui durcit à partir de -20°C permettant de conserver les tissus à une température de -80°C sans risque de dégradation dans le temps. La crosse aortique et l'aorte abdominale ont été fixées dans du formol pendant 24 h puis scellées dans de la paraffine afin de réaliser des coupes de $3\ \mu\text{m}$. Concernant ces dernières, un déparaffinage a été réalisé par des bains successifs dans du xylène puis dans de l'éthanol 100 %, 95 % et 70 % pour terminer par un bain d'eau distillée. Les coupes ont été, par la suite, soumises à une incubation de 20 min dans un bain de tampon citrate (*Dako*) afin de démasquer les antigènes, puis après un rinçage avec de l'eau distillée, le tampon *Hydrogen peroxide block (Dako)* a été utilisé pour bloquer les peroxydases endogènes. La saturation des sites aspécifiques a été réalisée à l'aide de la solution *Protein Block (Dako)* pendant 10 min à température ambiante. Après un rinçage au PBS, l'anticorps primaire anti-CathS (*Abcam*, dilué 1/100^{ème}) a été incubé, dans un tampon de dilution (*Cell marque*), sur les coupes toute la nuit à 4°C . Le lendemain, les coupes ont été lavées avec PBS puis incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé pendant 10 min à température ambiante suivi par une incubation avec la solution *Streptavidin Peroxydase (Dako)*. Enfin la solution d'aminoéthylcarbazole (*Thermo Scientific*) a été déposée pendant 10 min et une contre coloration d'hématoxyline (*Novacastra*) a ensuite été réalisée. Pour finir, les coupes ont été plongées dans des bains d'eau distillée suivis par des bains d'éthanol 100 %, 95 % et 70 % avant de terminer par un bain de xylène afin de pouvoir les monter entre lames et lamelle à l'aide d'une colle de montage, le glycergel (*Dako*).

6. Étude la rigidité artérielle

L'évaluation de la rigidité artérielle a été réalisé à l'aide d'un système "mouse doppler" (*Indus, Instrument, USA, Houston*). C'est une technique non invasive qui permet de mesurer la vitesse de déplacement de l'onde de pouls (VoP) entre l'aorte abdominal et la crosse aortique en utilisant des ultrasons. Pour cela, l'utilisation de deux sondes de fréquences différentes avec une sonde de 20 MHz placée au niveau de l'aorte abdominale et une de 10 MHz posée au niveau de la crosse aortique. Après détection des échos sanguins spécifiques ces deux emplacements, l'appareil mesure le temps de déplacement de l'onde qui associé à la distance entre les sondes permet d'obtenir la VoP (Figure 33) (362).

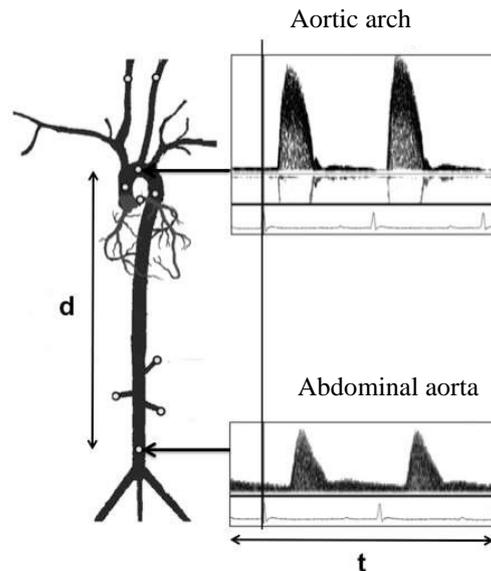


Figure 33 : Représentation des signaux obtenus au niveau de l'aorte et de la crosse aortique. La ligne verticale correspond à l'onde R de l'ECG et est utilisée pour mesurer le temps (t) d'arrivée d'un pulse et ainsi calculer la vitesse de l'onde de pouls par rapport à la distance (d) entre les deux électrodes. Modifié d'après Hartley et al, 2011, (362).

Pour suivre la progression de la VoP dans notre modèle murin, les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane (4 % pour l'induction et 2 % pour le maintien de l'anesthésie). Elles ont été ensuite placées sur le dos sur une plaque thermorégulée qui permet, à la fois de maintenir la température des souris mais aussi de suivre en direct la fréquence cardiaque grâce à la présence de capteurs sous les 4 pattes des souris. La sonde de 20MHz a été alors fixées à l'aide d'une potence dans la partie basse de l'aorte abdominale une fois son signal identifié. Ensuite, la sonde de 10MHz a été placée sur crosse aortique à l'endroit où son signal spécifique a été détecté. La distance entre les deux sondes a alors été mesurée grâce à un double décimètre. Le temps de déplacement de l'onde de pouls a été déterminé à l'aide du logiciel fourni avec le mouse doppler. Pour cela, des marqueurs spécifiques ont été placé sur le signal de la crosse aortique et de l'aorte abdominale permettant de déterminer le temps de déplacement de l'onde entre les 2. Ainsi, la VoP a été calculée selon la formule suivante :

$$v = \frac{d}{t}$$

d = distance entre les 2 sondes (cm) et t = le temps de déplacement de l'onde (ms).

Le suivi de la rigidité artérielle a été réalisée par une mesure mensuelle de la VoP dès la mise en place de l'IRC et jusqu'à 17 semaines après chirurgie.

7. Analyse des fibres élastiques

Afin d'observer le remodelage vasculaire au cours de l'IRC et plus particulièrement l'élastolyse, la propriété d'autofluorescence de l'élastine est utilisée dans notre étude. Il a été démontré dans la littérature que la présence de liaisons croisées dans la structure de l'élastine insoluble est responsable de cette particularité (363).

Cette technique permet après une excitation des coupes à 410 nm de récupérer un signal fluorescence à 500 nm pour la visualisation des fibres élastiques. Ainsi, sans coloration spécifique, l'élastolyse a été quantifiée par dénombrement des fractures retrouvées par fibres élastiques au niveau des crosse aortiques. Pour cela, les crosse aortiques fixées dans le formol ont été déparaffinées puis réhydratées en passant du xylène puis à l'éthanol 100 %, 95 % et 70 % pour finir par un bain d'eau distillée. Enfin, les coupes ont été déshydratées afin de pouvoir les placer entre lames et lamelles grâce à la colle de montage le glycergel (DAKO).

8. Évaluation de l'influence des EDPs issus de l'activité de la CathS sur le développement des calcifications vasculaires et de l'inhibition de Neu-1

8.1. **Évaluation de l'influence des EDPs issus de l'activité de la CathS sur le développement des calcifications vasculaires**

Le peptide P1 a été dissous dans du sérum physiologique (0,9 % de NaCl) afin d'être ensuite injecté par voie intra-veineuse à la concentration de 20 mg/kg. L'administration du peptide a été réalisée par une injection rétro-orbitale à raison d'une fois par semaine en alternant œil gauche et droit afin d'éviter toutes lésions oculaires. Des injections contrôles contenant du sérum physiologique ont été réalisées en parallèle des injections du peptide.

8.2. **Utilisation d'un inhibiteur de Neu-1 : le Tamiflu®**

L'Oseltamivir phosphate (Figure 34) (Roche, nommé également " Tamiflu® ") est un agent antigrippal utilisé contre la grippe H1N1. Il a cependant été décrit comme capable d'inhiber spécifiquement la neuraminidase-1 (Neu-1) (364).

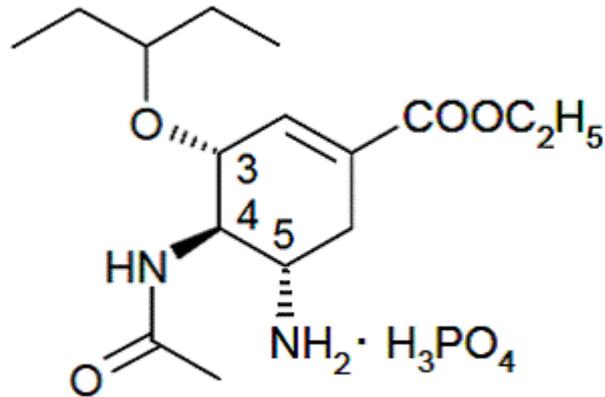


Figure 34 : Structure chimique du Tamiflu®

Le Tamiflu® a été administré par des injections intra-péritonéales tous les 2 à 3 jours à raison de 50 mg/kg. Il a été préparé dans du PBS à une concentration de 15 mg/ml puis est stocké à -20°C. Afin d'éviter toute inflammation de la zone d'injection, les piqûres ont été alternées entre la partie gauche et droite de l'animal.

9. Dosage de la CathS sérique

Le sang a été collecté dans un tube de 1,5 ml immédiatement après le sacrifice de l'animal par un prélèvement rétro-orbital grâce à un capillaire (*Hirschmann, Allemagne*). Le tube a ensuite été laissé à température ambiante pendant 2 h afin de permettre la coagulation des échantillons qui ont été ensuite centrifugés à 1000g pendant approximativement 20 min. Le sérum a été récupéré pour être rapidement conservé à -80°C afin d'être dosé à l'aide d'un kit ELISA spécifique de la CathS (*Cliniscience*). Lors du dosage, les échantillons ont été dilués au 1/5^{ème} dans du PBS et déposés dans la plaque en même temps que la gamme étalon de la solution standard de CathS pour une incubation de 2 h à 37°C. Après avoir vidé les puits, la solution de détection A a été ajoutée pendant 1 h à 37°C puis après 3 lavages, la solution de détection B a été incubée pendant 30 min à 37°C. Ensuite, après 5 lavages, la solution contenant le substrat a été ajoutée pendant 15 à 25 min à 37°C en étant protégée de la lumière. Enfin, la réaction a été arrêtée par la solution stop entraînant l'apparition d'une coloration jaune dont l'absorbance a été détectée à 450 nm par l'utilisation d'un lecteur de microplaques spectrofluorimètre *Infinite® F200 Pro* couplé au logiciel *Magellan* (TECAN).

F. Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés sous forme de la moyenne des données obtenues à partir de trois expériences indépendantes au minimum. Les valeurs moyennes ont été exprimées avec l'erreur standard à la moyenne (SEM). Le test de Student a été utilisé pour l'étude statistique des résultats obtenus de toutes les expériences *in vitro*. Concernant les expériences réalisées *in vivo* le test Mann Whitney a été utilisé (NS, non-significatif ; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Résultats

IV. Résultats

A. RAGE : un acteur clef dans le remodelage et les calcifications vasculaires

1. Caractérisation des modèles *in vivo*

La première partie de notre hypothèse de travail a concerné l'implication de RAGE dans le remodelage vasculaire au cours de l'IRC, et a été étudiée grâce à un modèle de vasculopathie urémique. Comme décrit en introduction, au cours de cette pathologie, il a été observé une accumulation de molécules pro-inflammatoires telles que la SAA (365) ou S100A12 (293). Il a de plus été démontré que ces protéines sont des partenaires d'interaction du récepteur RAGE (366,367) dont l'expression est également augmentée au cours de l'urémie (292). Du point de vue métabolique, une augmentation de la concentration d'urée, de calcium, de phosphate, et de diverses classes lipidique est également observée, concourant à l'amplification des processus d'athérosclérose et de calcifications vasculaires. Nous avons mis au point au laboratoire un modèle d'urémie utilisant des souris ApoE^{-/-}, présentant une délétion ou non du récepteur RAGE, dans lequel toutes ces caractéristiques sont retrouvées. Ce modèle de vasculopathie urémique est induit par une néphrectomie des 5/6^{ème} du rein gauche suivie d'une néphrectomie totale du rein controlatérale (figure 35).

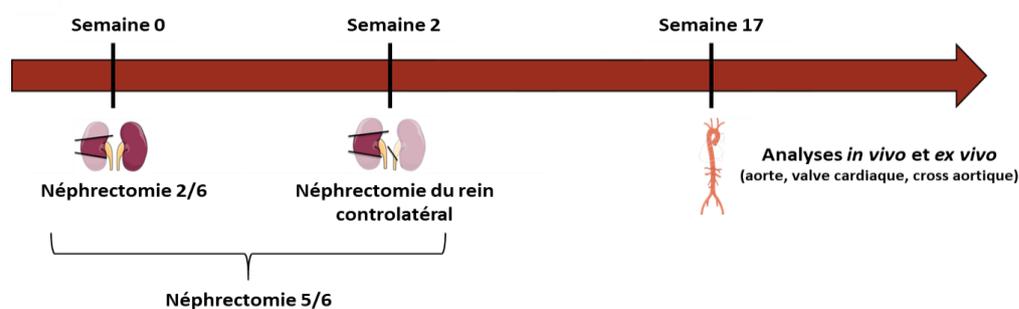


Figure 35 : Schéma illustratif de la procédure suivie pour induire une IRC

Les différentes variables biochimiques dosées dans le sérum des animaux ont permis de valider l'induction d'une urémie avec une valeur d'urée 2 fois supérieure chez les ApoE^{-/-} IRC comparée aux ApoE^{-/-} Sham (Tableau 3).

	ApoE ^{-/-} / Sham	ApoE ^{-/-} / IRC	P value
Urée mmol/l	10,9 ± 1,38	23,5 ± 3,8	< 0,001
Calcium mmol/l	2,4 ± 0,06	2,6 ± 0,1	< 0,001
Phosphate mmol/l	3,13 ± 0,2	3,73 ± 0,2	< 0,05
Cholestérol mmol/l	12,3 ± 2,3	15,2 ± 1,61	< 0,01
Triglycérides mmol/l	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,6	NS

Tableau 3 : Dosage de différentes variables biochimiques dans le sérum de souris ApoE^{-/-} Sham et ApoE^{-/-}IRC après 17 semaines (n= 9)

Après 17 semaines d'urémie, les aortes ont été prélevées afin d'analyser l'expression génique de RAGE. Les résultats montrent, d'une part, que RAGE est 5 fois plus exprimé chez les souris ApoE^{-/-}IRC comparé au souris ApoE^{-/-}Sham (Figure 36A). D'autre part, les données de RTqPCR soulignent également que la délétion de RAGE entraîne une diminution très importante, d'environ de 300 fois, de l'expression de RAGE chez les souris DKO (ApoE^{-/-}RAGE^{-/-}) comparée aux souris ApoE^{-/-} (Figure 36B). Il est de plus important de noter que la délétion de RAGE n'impacte pas les caractéristiques biochimiques précitées de notre modèle.

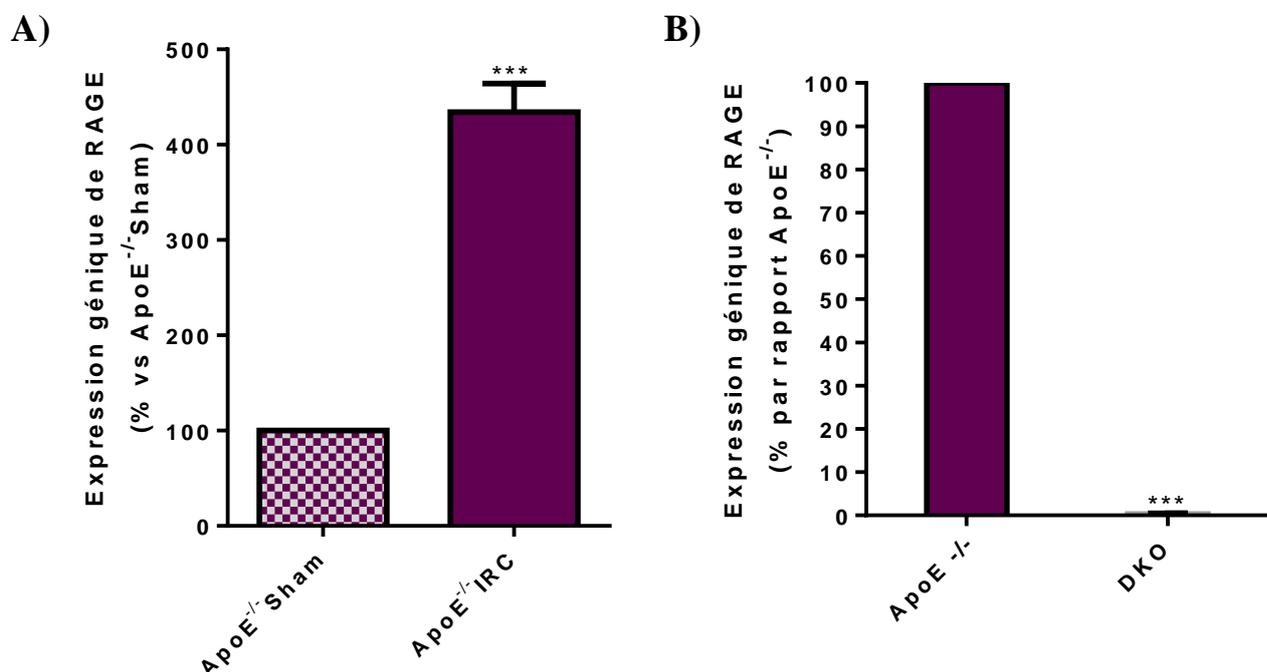


Figure 36: Étude de l'expression de RAGE dans nos modèles animaux. A) : Impact de l'urémie sur l'expression génique de RAGE après 17 semaines d'urémie (n= 13). B) : Validation de la délétion de RAGE au niveau transcriptionnel dans les aortes de souris ApoE^{-/-} et DKO. p < 0,001 *** (n= 9)

Ce modèle d'urémie permet de plus d'obtenir un développement plus important des plaques d'athérosclérose. En effet comme le montre la figure 37, le développement des plaques d'athérome est plus important chez les souris qui ont subi la néphrectomie comparé au souris Sham.

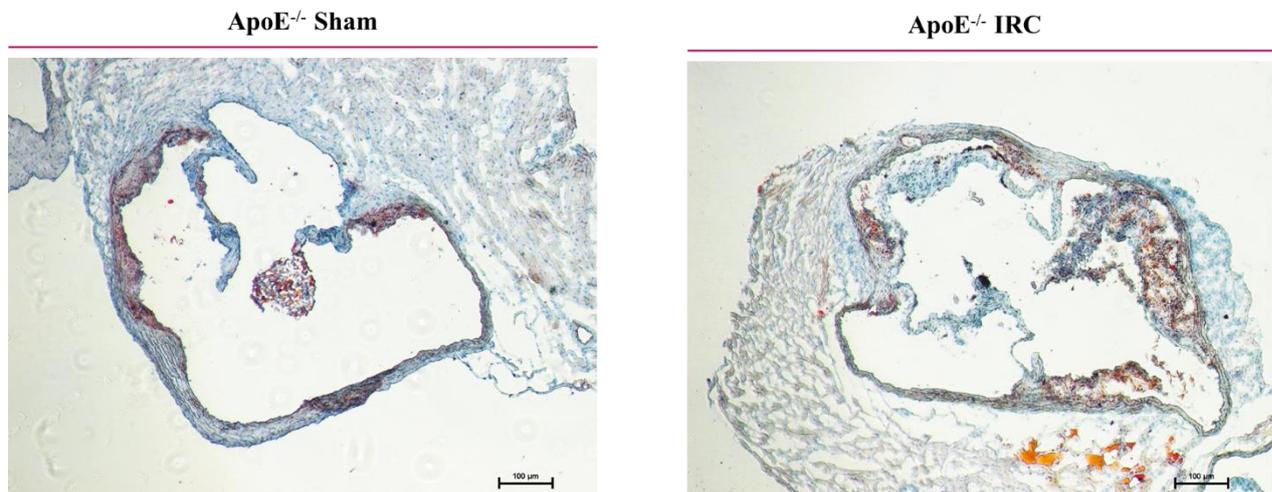


Figure 37 : Analyse des plaques d'athérome dans notre modèle ApoE^{-/-} d'IRC. Photographies illustratives des valves aortiques après 17 semaines d'IRC. Après une coloration à l'huile rouge, les plaques d'athérome apparaissent sous forme d'un marquage rouge-brun. Bar d'échelle = 100µm. n = 9.

Ainsi, notre modèle reproduit au mieux les caractéristiques physiopathologiques et les complications vasculaires de l'IRC, et la délétion de RAGE est effective. Ces données nous permettent de pouvoir sereinement utiliser ces modèles murins pour les études ultérieures.

2. Étude du rôle de RAGE dans le remodelage vasculaire au cours de l'IRC : acteur clef dans la survenue des calcifications et l'élastolyse vasculaire.

Afin d'étudier le rôle joué par RAGE dans la survenue des calcifications et l'élastolyse vasculaire au cours de l'IRC, nous avons utilisé nos modèles ApoE^{-/-} IRC et DKO IRC. Ainsi, après 17 semaines d'urémie, l'imagerie pré-clinique avec l'utilisation du FMT a permis d'estimer les calcifications vasculaires directement au sein de l'animal sans sacrifice. Cette technique quantifie la fixation d'une sonde fluorescente spécifique des zones de microcalcifications et de remodelage osseux. Afin d'être reproductible, une zone d'intérêt de quantification identique a été appliquée à l'ensemble des sujets donnant ainsi une concentration de la sonde en pmol. Le FMT est une modalité d'imagerie pré-clinique non-invasive permettant de quantifier l'intensité de fluorescence. Cependant, elle ne permet pas d'obtenir des données

morphologiques, rendant impossible la détermination précise de la localisation du signal. Néanmoins, au vu des images obtenues, les calcifications sont localisées dans la zone où se trouve théoriquement l'aorte chez la souris. Après quantification du signal de fluorescence, les résultats montrent que les souris DKO présentent 35% de moins de calcifications que les souris ApoE^{-/-} (Figure 38A). Pour confirmer ces observations *in vivo*, les calcifications ont également été recherchées sur coupes histologiques à l'aide de la coloration von Kossa, au niveau des valves cardiaques. Cette coloration permet d'observer les dépôts anormaux d'ions calcium liés au phosphate sous forme de points noirs. Les photographies illustratives montrent une coloration plus importante et plus intense chez les souris urémiques ApoE^{-/-} comparée au souris urémiques DKO (Figure 38B).

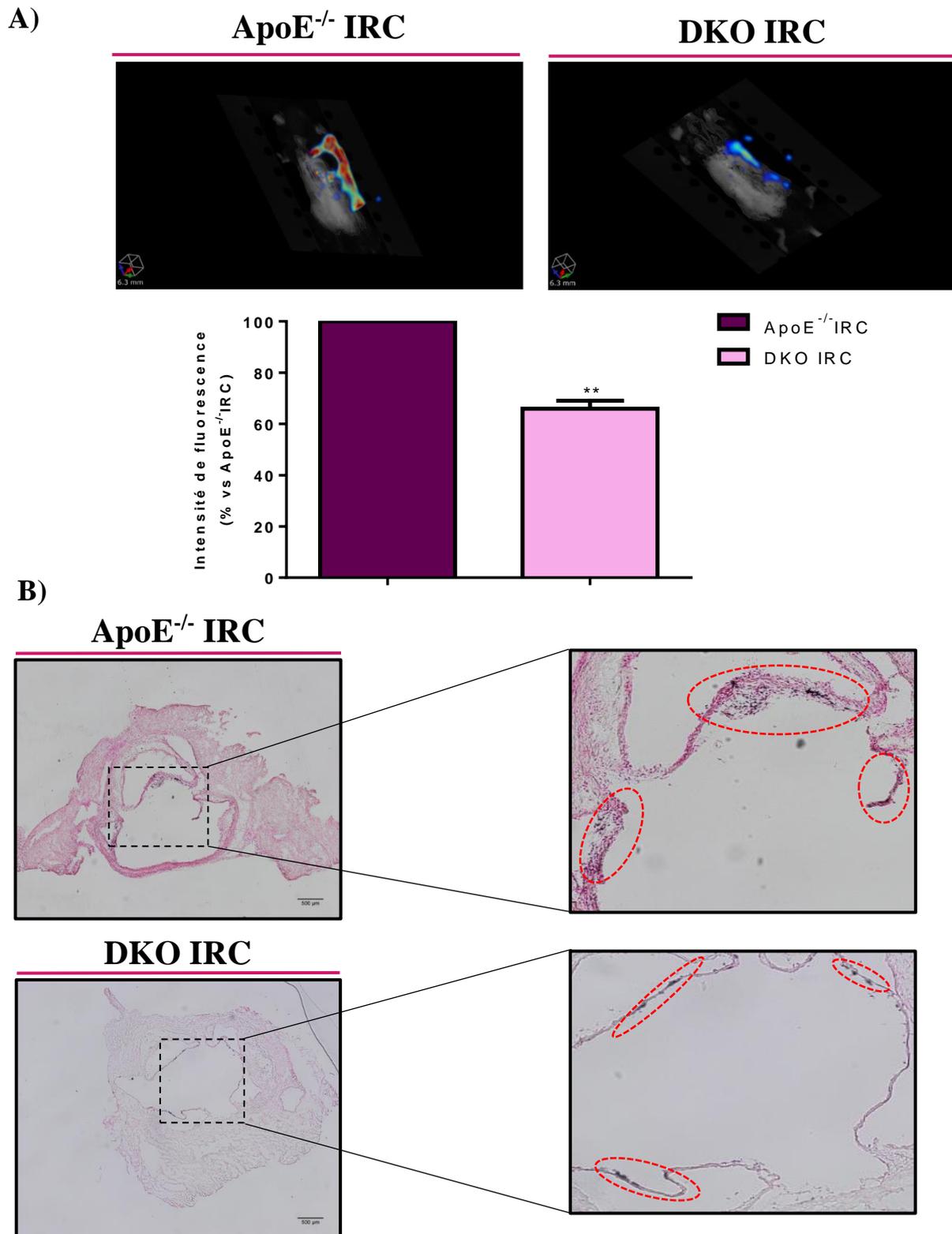


Figure 38 : Analyse du rôle de RAGE dans la survenue des calcifications vasculaires. **A)** : Image illustrative du signal provenant de la sonde Ostéosense après 17 semaines d'urémie. L'analyse des résultats permet de quantifier la concentration de sonde fixées au niveau des zones de calcifications après avoir déterminé une zone d'intérêt. ** $p < 0,01$. **B)** : Photographies illustratives des valves cardiaques prélevées après 17 semaines d'urémie. Après une coloration Von Kossa, les zones de calcifications apparaissent sous forme de points noirs et sont identifiées par les pointillés rouges. Bar d'échelle = 500 μ m (n = 9)

L'ensemble des résultats obtenus par FMT et histologie montrent que dans les souris ApoE^{-/-}IRC, les calcifications sont bien observées. La délétion de RAGE provoque une diminution importante de la présence de calcifications vasculaires.

Au cours de l'IRC, les calcifications vasculaires sont principalement localisées au niveau des zones de fractures des fibres élastiques (173). Nous avons donc naturellement analysé l'élastolyse vasculaire et avons posé la question du rôle de RAGE dans ce processus. L'évaluation de l'intensité de l'élastolyse s'est effectuée en utilisant les propriétés d'autofluorescence de l'élastine permettant la visualisation des différentes fibres et le dénombrement des points de rupture au sein de ces fibres. Les fibres élastiques excitées ont en effet la capacité d'émettre à une longueur d'onde de 500 nm lorsqu'elles sont excitées à 410 nm, phénomène que nous avons déjà utilisé afin d'évaluer l'élastolyse vasculaire (191) (368).

Après 17 semaines d'urémie et évaluation du nombre de cassures, il a été retrouvé une moyenne de 20 cassures par fibre dans les crosses aortiques ApoE^{-/-} IRC comparée aux souris DKO IRC dans lesquelles une moyenne de 6 cassures a été obtenue (Figure 39).

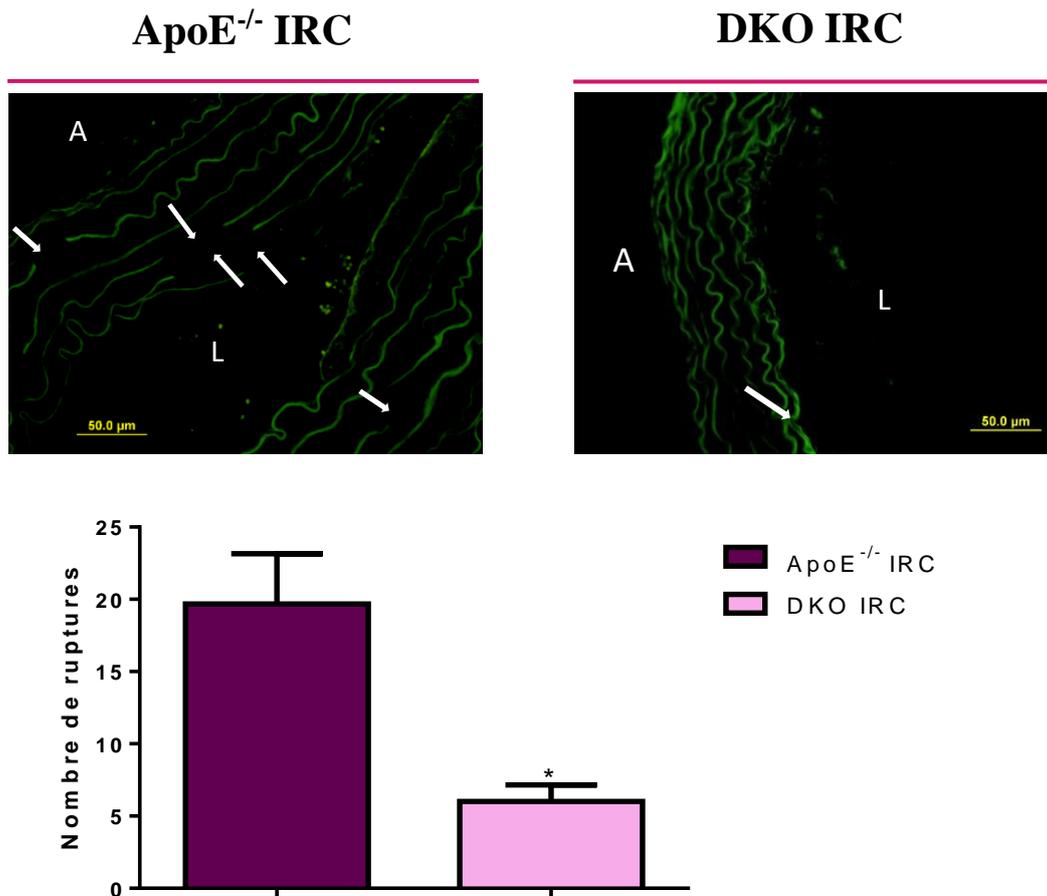


Figure 39 : Analyse de l'élastolyse vasculaire et quantification du nombre de ruptures présentes au sein des fibres. Photographies représentatives des fibres élastiques présentes au sein des crosses aortiques dans les deux groupes de souris urémiques après 17 semaines d'urémie. L'évaluation de l'élastolyse est réalisée en dénombrant le nombre de cassures par fibre (flèche blanche). $p < 0,05^*$ (A : adventice, L : lumière) ($n = 9$)

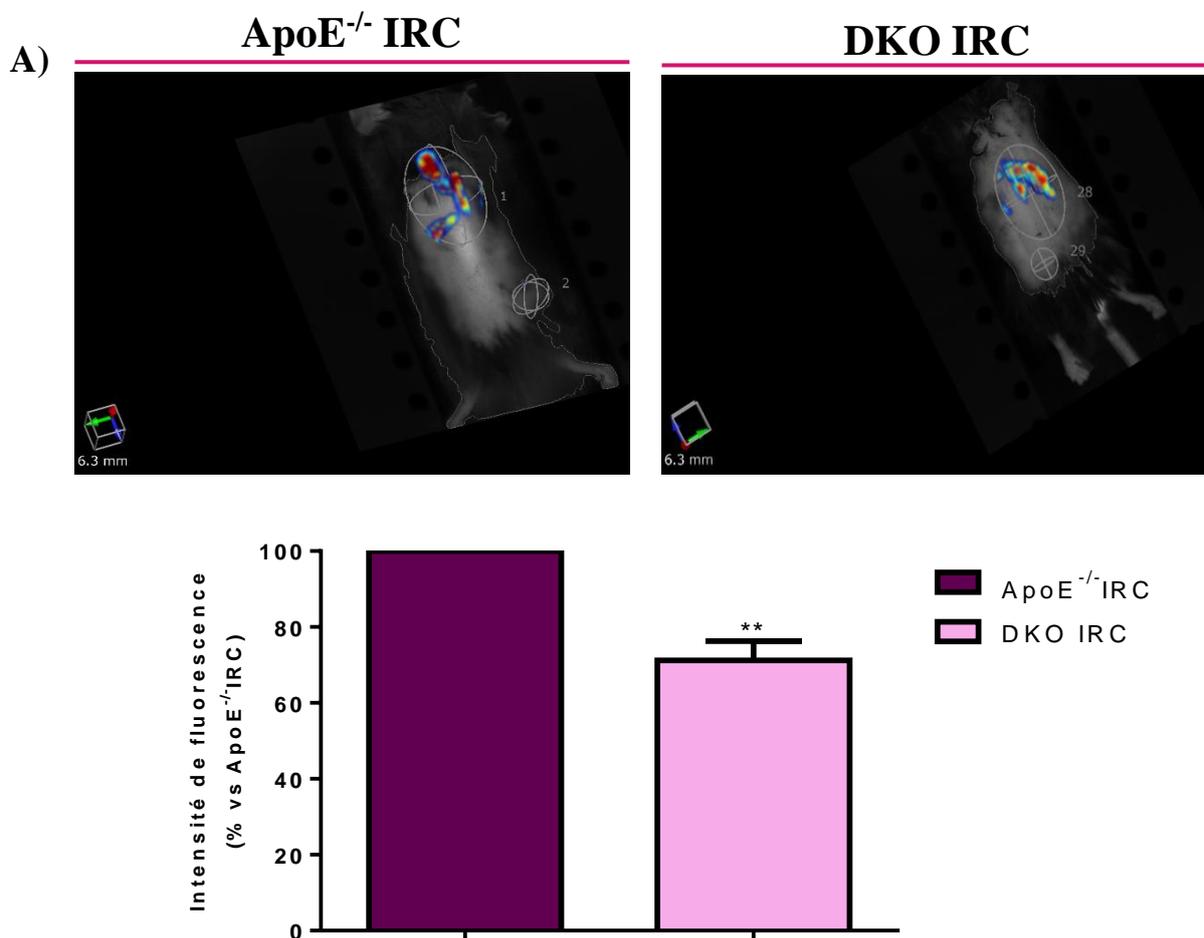
De manière extrêmement intéressante, ces résultats montrent que RAGE est engagé de façon importante dans les processus d'élastolyse accentués au cours de l'IRC. Ce récepteur étant doué d'activité de signalisation et de régulation d'expression génique, nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait être impliqué dans l'expression d'élastases. Dans ce cadre, des études cliniques ont mis en évidence que l'expression d'une cathepsine, la CathS augmentait au cours de l'IRC (174) et des données issues de modèles murins ont confirmé cela (348). De plus, dans la famille des cathepsines, seule la S démontre une corrélation négative entre le taux sérique et l'évolution du DFG montrant une accumulation de cette protéase au fur et à mesure que la fonction rénale diminue. Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de celle-ci a montré une diminution de calcifications vasculaires associées à l'IRC démontrant l'existence d'une corrélation positive entre la CathS et les processus de remaniement vasculaire (30,175).

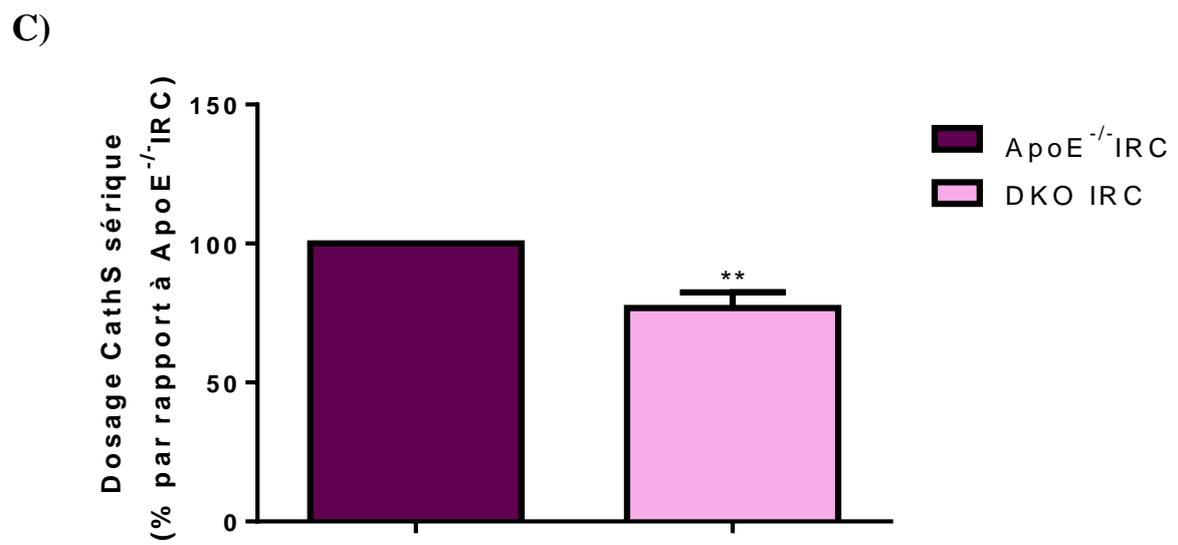
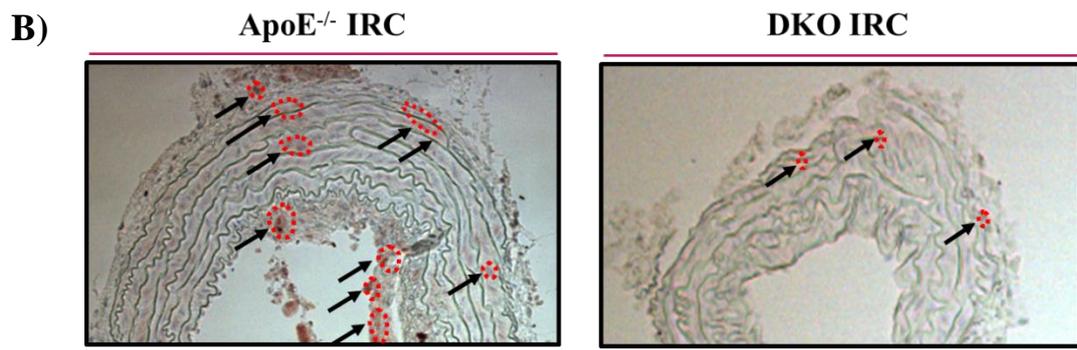
Forts de ces constats, nous avons analysé le rôle de RAGE dans l'activité des cathepsines *in vivo* puis plus précisément dans l'expression de la CathS par les CMLs vasculaires.

3. RAGE, un potentiel inducteur de la CathS au cours de l'IRC ?

Pour vérifier cette hypothèse, notre modèle de vasculopathie urémique présentant une délétion pour RAGE a été utilisé. La détection de l'activité des cathepsines *in vivo* est possible grâce à une sonde activable émettant un signal fluorescent après avoir été clivée par diverses cathepsines, dont la CathS. Vingt-quatre heures post-injection, les souris sont placées dans le tomographe de fluorescence moléculaire afin de détecter et de quantifier l'activité des cathepsines dans les différents groupes d'animaux. Après avoir défini une région d'intérêt applicable à l'ensemble des sujets, la concentration de sonde reflétant l'activité enzymatique des cathepsines est déterminée. L'analyse des données montre une augmentation de 30 % du signal fluorescent chez les souris ApoE^{-/-} IRC par rapport aux souris DKO IRC après 17 semaines d'urémie (Figure 40A). Afin de confirmer que cette augmentation d'activité pourrait être principalement attribuée à une intensification de l'expression de la CathS, des marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur les crosses aortiques. Les photographies illustratives montrent un marquage ponctiforme plus intense au niveau des crosses aortiques des souris ApoE^{-/-} IRC comparé aux crosses aortiques extraites des souris DKO (Figure 40B). De plus, le dosage plasmatique de la CathS montrant une diminution de 30% de son expression chez les DKO IRC comparé aux ApoE^{-/-} IRC confirme ces résultats (Figure 40C) ainsi que les données cliniques et pré-cliniques issues de la bibliographie ayant montré une forte expression de la CathS en condition d'IRC. L'ensemble de ces résultats semblent indiquer que la délétion de RAGE entraîne une nette diminution de l'activité des cathepsines corrélée en grande partie avec une atténuation de l'expression de la CathS. Afin de confirmer ce potentiel lien entre la CathS et RAGE, des études *in vitro* ont été menées en utilisant des MOVAS-1 comme modèle cellulaire. Ce choix s'est appuyé sur des données bibliographiques montrant qu'une stimulation des CMLs par des cytokines pro-inflammatoires exprimées au cours de l'IRC telle que l'IFN- γ a montré une augmentation de l'expression de la CathS au niveau membranaire (121). De plus, les CMLs ont été identifiées comme le principal type cellulaire à l'origine des calcifications vasculaires retrouvées au cours de l'IRC (369). En se basant sur l'ensemble de ces données, les CMLs ont été identifié comme un modèle *in vitro* pertinent pour l'étude de l'expression de la CathS et des mécanismes de calcifications. Ainsi pour confirmer la relation entre RAGE et la

CathS, ce modèle cellulaire a été traité avec un ligand de RAGE, le S100A12, connu pour s'accumuler progressivement dans le sang des patients en condition d'IRC. L'expression de la CathS a été détectée par immunofluorescence couplée à une quantification du signal grâce à l'élaboration d'une macro fonctionnant sur le logiciel ImageJ. Ainsi après avoir réalisé 10 images par conditions avec une moyenne de 20 cellules par champs, une augmentation de 60 % du signal fluorescence a été observé lorsque les CMLs sont traitées avec du S100A12 comparé à la condition contrôle. Ces données montrent ainsi qu'un ligand de RAGE s'accumulant lors de l'IRC est capable de stimuler l'expression de la CathS (Figure 40D). L'ensemble de ces résultats confirment que RAGE est un des acteurs moléculaires responsable de l'expression élevée de la CathS au cours de l'IRC.





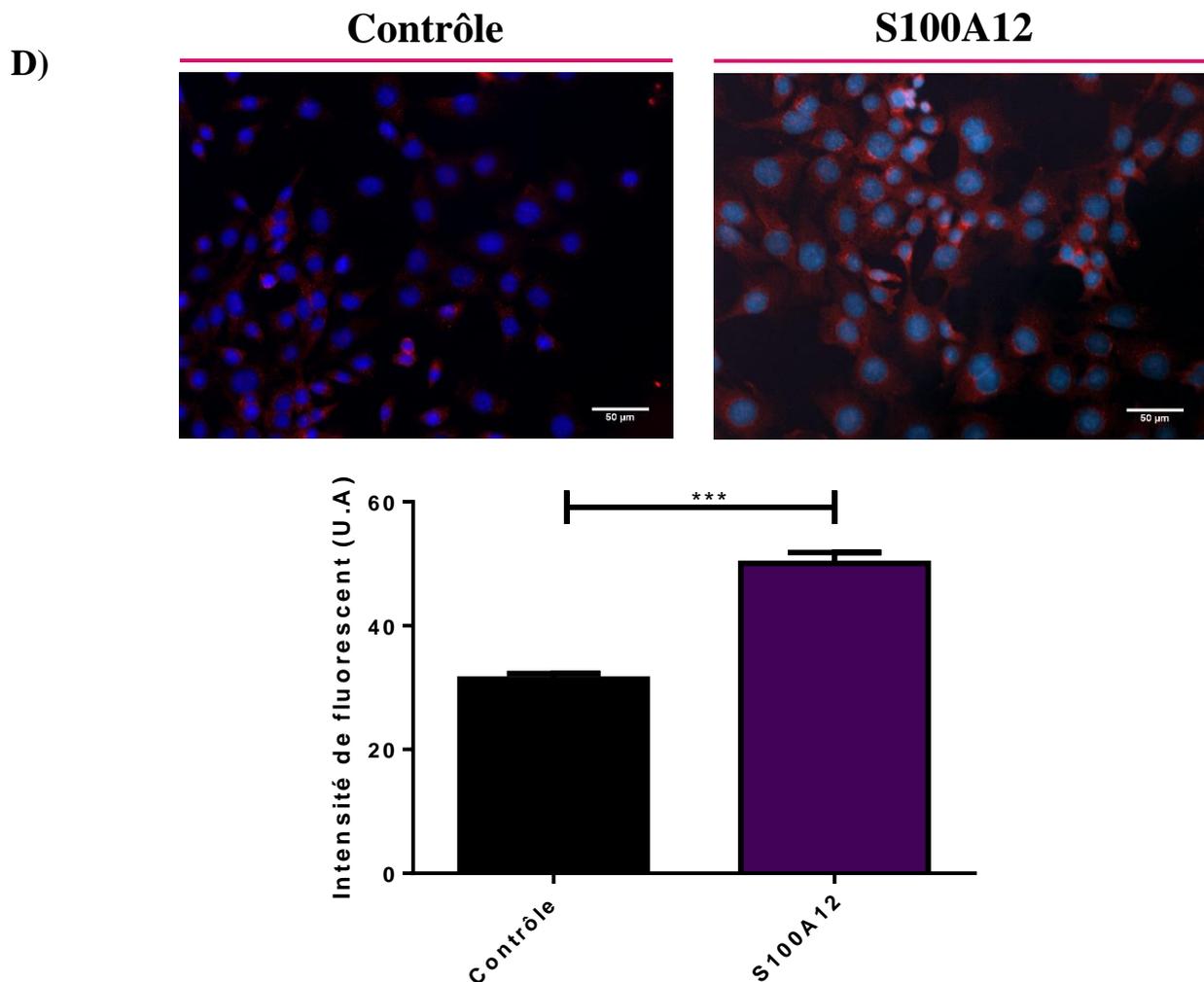


Figure 40 : Analyse du rôle de RAGE dans l'expression de la CathS *in vivo* et *in vitro*. **A)** : Image illustrative du signal provenant de la sonde Prosense à 17 semaines d'urémie. Après avoir délimité une zone d'intérêt (en blanc), l'analyse des résultats permet de quantifier la concentration de sonde à la suite de son clivage par les cathepsines. ** $p < 0,01$. ($n = 9$). **B)** : Photographie illustratives des crosses aortiques extraites après 17 semaines d'IRC. La Cath S, mise en évidence par un anticorps anti-cathepsine S, apparaît sous forme d'un marquage ponctiforme (pointillés rouges). **C)** : Les sérums des souris ApoE^{-/-} IRC et DKO IRC ont été récupérés après 17 semaines d'urémie. La CathS circulante a été dosée à l'aide d'un kit ELISA spécialement dédié ($n=9$). **D)** : Photographies illustratives de l'expression de la CathS avant et après traitement des CMLs avec le S100A12 (50 µg/ml). L'expression de la CathS a été déterminée par microscopie de fluorescence grâce à un anticorps anti-CathS (1/50) révélé par un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor-568 (rouge). Les noyaux ont été marqués avec du DAPI. La barre d'échelle indique 50 µm. La quantification du signal fluorescent a été réalisée à l'aide d'un sous-programme du logiciel ImageJ. ($n=9$) *** $p < 0,001$.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette première partie montrent ainsi que RAGE est impliqué dans la survenue de calcifications vasculaires au cours de l'IRC, que ce récepteur est engagé dans la production de CathS, mais également dans l'élastolyse vasculaire observée. Afin de faire le lien entre l'expression accrue de cette cathepsine, la dégradation de l'élastine mais aussi la potentielle production d'EDPs bioactifs pro-calcifiants par cette protéase, la suite de notre travail a été axé sur la caractérisation de l'activité élastolytique de la CathS sur des

fibres d'élastine vasculaire. En effet, peu de données étaient disponibles concernant l'étude de son activité vis-à-vis de ces fibres, et aucune concernant la production d'EDPs bioactifs.

B. La Cathepsine S : une protéase impliquée dans le remodelage de l'élastine et la production d'EDPs potentiellement bioactifs

1. Analyse de la dégradation de l'élastine insoluble vasculaire par la CathS

L'étude de l'activité enzymatique de la CathS a montré qu'elle possède une activité collagénolytique (330) mais aussi une activité élastolytique dont l'efficacité semble plus importante sur l'élastine extraite d'aorte comparée à celle provenant de poumons ou de ligaments (181). Cependant, la méthode de préparation de l'élastine est cruciale dans ce type d'étude, et la méthode Lansing, très drastique, fût souvent utilisée pouvant mener à des conclusions erronées. Bien que différentes études sur modèles animaux furent menées et suggèrent une corrélation entre l'expression de la CathS, l'élastolyse vasculaire et le développement de l'athérosclérose et des calcifications au cours de l'IRC (232,370), le lien entre élastolyse, production d'EDPs bioactifs par la CathS et calcifications, pouvant expliquer ces résultats n'a pas été mis en évidence.

Pour répondre à cette question, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'activité élastolytique de la CathS dans le cadre de l'analyse des EDPs libérés suite à la digestion de l'élastine, en utilisant des technologies de microscopie électronique à balayage et de spectrométrie de masse. Il existe diverses techniques d'extraction pour obtenir de l'élastine insoluble qui peut de plus être produite à partir de différents tissus comme de l'aorte ou du ligament de cou. La technique utilisée et le tissu choisi conditionne le type d'élastine obtenue après extraction. Dans notre laboratoire, la technique utilisée est la méthode Lansing sur du ligament de cou de bœuf permettant d'obtenir de l'élastine insoluble dont la composition en acides aminés correspond parfaitement à celle prédite (371). Cependant ce type d'extraction alcaline utilise des conditions expérimentales agressives entraînant un index de dégradation important (372). En parallèle, une collaboration avec le Dr Schmelzer a permis de travailler avec de l'élastine insoluble extraite à partir d'aorte selon une méthode adaptée de celle de Daamen. C'est une technique qui utilise des procédés plus doux permettant l'obtention d'une élastine insoluble dont la qualité est la même que celle obtenue avec la méthode Lansing mais avec un faible taux de dégradation (373). Nous avons de plus utilisé de la tropoélastine

recombinante afin d'étudier l'influence de la CathS sur ce monomère soluble. Les deux types d'élastine insoluble et la tropoélastine ont été digérées avec de la CathS recombinante pendant 8h ou 24h. La réaction enzymatique fût ensuite arrêtée avec de l'acide trichloracétique afin de récupérer d'une part le tampon de digestion qui a été analysé par spectrométrie de masse et d'autre part l'élastine insoluble afin de l'observer à l'aide d'un microscope électronique à balayage.

Les photographies illustratives de l'élastine obtenue par la méthode Lansing après 8h montrent, en absence de CathS, un aspect irrégulier avec une surface lacérée. L'action de la CathS sur ce type d'élastine après 8 h de digestion a entraîné une désorganisation de l'élastine avec la présence de fissures. De plus, les photographies montrent également la présence de nombreux pores au sein de ce réseau. Après 24 h de digestion, ce type d'élastine insoluble présente le même aspect qu'à 8 h dans les mêmes conditions expérimentales et l'ajout de la CathS entraîne une augmentation du nombre de pores présents au sein de ce réseau en plus des fissures. De plus, des fibres amincies voire déchirées sont également observée dans ces conditions expérimentales. Concernant l'élastine insoluble obtenue par la méthode de Schmelzer, après 8h sans CathS, les photographies montrent des fibres organisées, parallèles les unes aux autres avec une surface lisse. L'adjonction de la CathS entraîne la dégradation importante de l'élastine avec la présence de nombreuses cavités et de fissures au sein de ce réseau. Après 24 h sans enzyme, les fibres élastiques sont toujours parallèles les unes aux autres avec un aspect lisse pour la plupart d'entre elles. Dans ces mêmes conditions expérimentales, l'addition de la CathS engendre une désorganisation totale du réseau. De plus, de nombreuses zones de dégradation allant jusqu'à la formation de trous dans la structure de ce réseau ont également observées (Figure 41). Enfin, après incubation de l'enzyme puis précipitation au TCA, aucun culot de tropoélastine n'a pu être obtenu suggérant une dégradation totale.

Ces images montrent, tout d'abord, que la méthode d'obtention de l'élastine conditionne l'aspect des fibres d'élastine puisque l'élastine obtenue avec la méthode de Lansing présente un aspect plus altéré que l'élastine produite selon Schmelzer qui se rapproche des fibres élastiques pouvant être retrouvées physiologiquement. De plus, ces observations confirment la capacité de la CathS à dégrader de l'élastine insoluble et à modifier son organisation pour les deux types d'élastine.

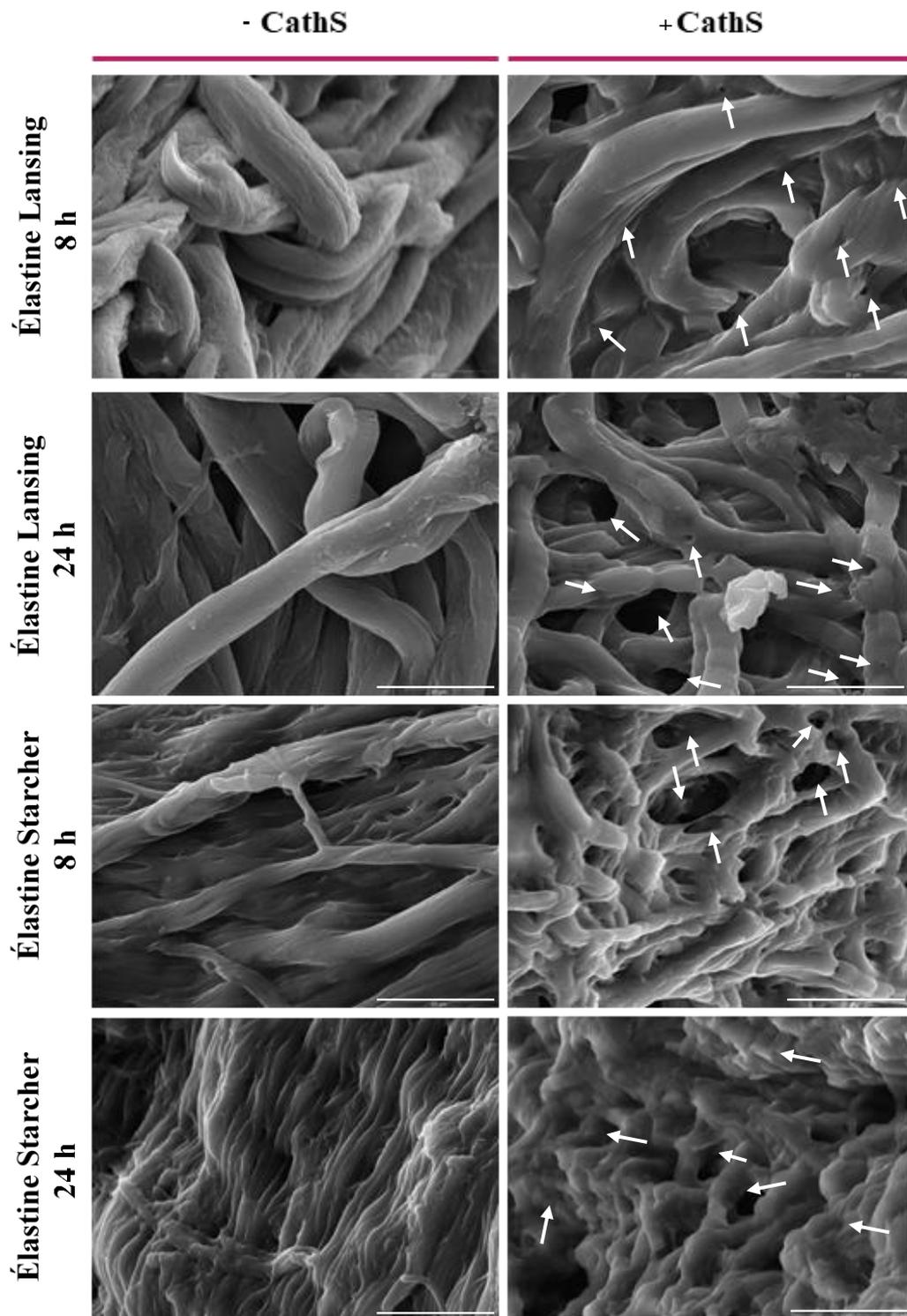


Figure 41 : Impact de l'activité protéolytique de la CathS sur la morphologie de l'élastine insoluble. Photographies illustratives obtenues par microscopie électronique à balayage (20 keV, grandissement x2000) de deux types d'élastine bovine insoluble (élastine de ligament de nuque préparée par la méthode de Lansing et élastine d'aorte préparée par la méthode de Schmelzer). Les images des échantillons ont été réalisées après 8h ou 24h dans le tampon de digestion adapté à la CathS avec et sans enzyme. Bar d'échelle : 20 μ m. (n=4)

L'évaluation des EDPs produits à la suite de la digestion des deux types d'élastine insoluble et de la tropoélastine par la CathS a été réalisée par spectrométrie de masse. L'analyse du tampon de digestion récupéré après l'action de la CathS sur les différents substrats a mis en évidence de nombreux sites de clivage tout au long de la séquence de la tropoélastine et des deux types d'élastine insoluble. La CathS est donc capable d'agir sur ces trois substrats avec une variation d'efficacité de dégradation conduisant à la production de 396 peptides, 262 peptides et 68 peptides après, respectivement, dégradation de la tropoélastine (Figure 42A), de l'élastine obtenue par la méthode de Lansing (Figure 42B) et celle obtenue par la technique de Schmelzer (Figure 42C). Ainsi, l'activité élastolytique de la CathS est plus importante lorsqu'il s'agit de monomères d'élastine soluble, comparé à des fibres d'élastine insoluble. De plus, comme décrit précédemment, la méthode de Lansing permet d'obtenir de l'élastine insoluble dont les fibres sont détériorées comparativement à celle produite selon Schmelzer. Ainsi, on constate que la CathS dégrade plus efficacement l'élastine insoluble lorsque les fibres d'élastine présentent des zones altérées préexistantes comparée à un substrat présentant des fibres quasiment intactes.

A)





B)



C)

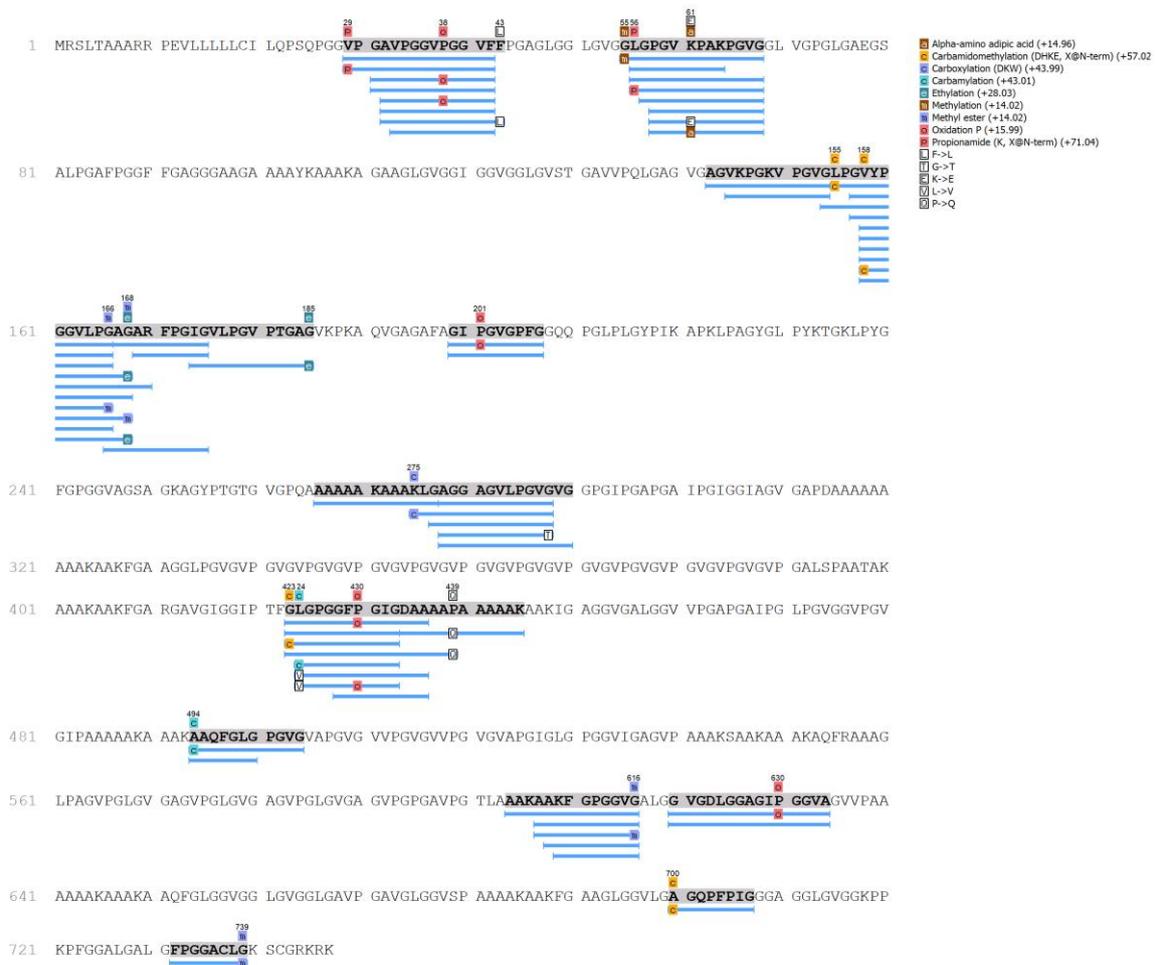


Figure 42 : Analyse des peptides produits suite à la digestion de la tropoélastine et d'élastines insolubles par la CathS. A) : Identification des peptides libérés après digestion de la tropoélastine. B) : Détermination des peptides obtenus après digestion de l'élastine insoluble de nuque de bœuf obtenue par la méthode de Lansing. C) : Caractérisation des peptides présents dans le tampon de digestion après action de la CathS sur l'élastine insoluble extraite par la technique de Schmelzer. Les trois espèces moléculaires testées sont sensibles à l'action de la CathS de manière différente, la tropoélastine étant la plus sensible, suivie de l'élastine préparée par la méthode de Lansing puis par celle préparée selon la méthode de Schmelzer. (n=4)

De manière intéressante, la CathS semble pouvoir dégrader les 3 types moléculaires testés de manière relativement homogène sur toute la longueur de la séquence, même si de zones préférentielles semblent se dégager, particulièrement visible pour l'élastine Schmelzer. Cependant, afin de caractériser cela de manière plus précise, nous avons réalisé une étude comparative des sites de clivages, pour les deux types d'élastine insoluble.

2. Caractérisation des sites de clivages préférentiels pour la CathS vis-à-vis de deux types d'élastine insoluble.

Par l'analyse des peptides produits il est possible de proposer quels acides aminés sont majoritairement retrouvés au niveau du site de clivage des substrats par la CathS. Pour rappel, la nomenclature des sites de coupures enzymatiques pour les protéases suit une logique de sites de fixation des acides aminés du substrat (nommés P et P') sur le site actif de l'enzyme (nommés S et S'). Après analyse des résultats de masse, il apparaît que le site actif de la CathS accommode bien des résidus aliphatiques, hydrophobes et de petite et moyenne taille. En effet, la glycine, l'alanine, la valine mais aussi l'acide aminé cyclique proline sont les principaux acides aminés retrouvés au sein des positions P1-P4 et P'1-P'4. Ils représentent en effet environ 80% des acides aminés trouvés au sein de ces sites pour la tropoélastine mais aussi pour les deux types d'élastine insoluble. De manière intéressante, la glycine apparaît comme l'acide aminé retrouvé majoritairement à toutes les positions (Figure 43A). Une analyse des acides aminés présents au niveau du site de coupure P1-P'1 par dénombrement de ces derniers dans les peptides après coupure confirme l'importance de la glycine, les profils obtenus pour les deux types d'élastine étant de plus semblables. En effet, la glycine est l'acide aminé le plus représenté avec 60 acides aminés en position P1 et 120 acides aminés en position P1', suivi par l'alanine, la valine et enfin la proline (Figure 43B).

A)

Amino acid	P ₄ / %		P ₃ / %		P ₂ / %		P ₁ / %		P ₁ ' / %		P ₂ ' / %		P ₃ ' / %		P ₄ ' / %	
G	31	33	42	44	23	24	51	51	37	38	35	32	35	37	35	35
A	18	16	15	12	13	10	11	11	18	16	14	14	14	14	13	13
V	14	15	15	15	23	24	12	10	20	21	20	20	20	17	17	18
L	6	7	4	4	12	12	5	7	5	5	8	9	6	4	3	5
I	1	2	3	3	4	4	2	1	3	3	2	3	1	2	3	3
F	5	4	2	3	3	3	3	4	2	3	1	3	2	2	2	2
Y	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
K	3	3	2	4	1	1	4	4	2	1	0	1	2	2	4	3
P	18	17	10	11	17	17	8	8	11	11	14	16	14	16	13	18
T	0	0	2	1	1	2	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
Q	1	2	1	2	1	2	0	1	0	0	1	1	1	2	1	1
Substrate	EH	ER	EH	ER	EH	ER	EH	ER	EH	ER	EH	ER	EH	ER	EH	ER

B)

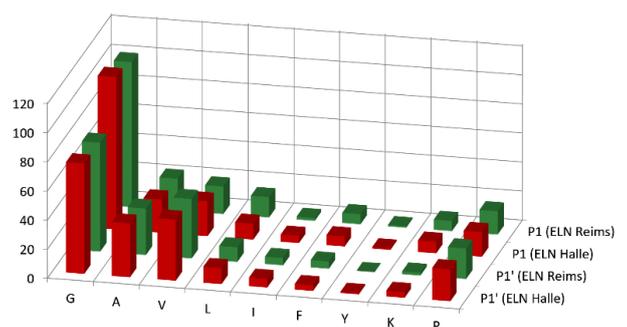


Figure 43 : Analyse des préférences de la CathS vis-à-vis des résidus P1-P4 et P'1-P'4 des substrats utilisés. A) : Occurrence de différents résidus d'acides aminés aux positions du substrat P1-P4 et P'1-P'4 après digestion de l'élastine insoluble obtenue par la méthode de Schmelzer (EH) et celle produite par la technique de Lansing (ER). Les valeurs sont exprimées en pourcentage et basées sur le nombre de site de clivages identifiés par spectrométrie de masse. B) : Dénombrement des différents acides aminés trouvés dans les peptides au niveau P1 et de P1' après digestion des deux types d'élastine insoluble. ELN Reims : Élastine Lansing, ELN Halle : Élastine Schmelzer

L'analyse des séquences peptidiques produites a été réalisée en portant une attention toute particulière au motif GxxPG, très largement retrouvé dans la séquence d'EDPs bioactifs déjà étudiés, et responsable de leur bioactivité (47,195). Les données de spectrométrie de masse ont révélé, dans le cas de la tropoélastine, l'existence de 64 EDPs possédant ce motif. Concernant l'élastine dérivée de la méthode Lansing, 51 motifs sont retrouvés alors que pour la méthode de Schmelzer, seuls 28 motifs ont été retrouvés. Il apparaît que la dégradation de la tropoélastine conduit à une quantité plus importante de peptides potentiellement bioactifs, suivie par les méthodes de Lansing et de Schmelzer, cela étant cependant logique au vu du nombre total de peptides décrit en figure 42.

L'élastine insoluble produite par la méthode de Schmelzer est considérée comme étant la plus proche structurellement de celle trouvée physiologiquement, car peu dégradée par les processus d'extraction. Ainsi, nous avons décidé de sélectionner des peptides à partir de ceux produits *via* cette méthode, dans le but d'évaluer leur potentiel effet pro-calcifiant, en postulant du fait qu'ils seraient certainement plus proches de ceux produits en conditions physiopathologiques d'IRC *in vivo*, contrairement à ceux obtenus après une extraction de type Lansing. De plus, lors de notre processus de sélection nous y avons ajouté d'autres contraintes. Les peptides choisis devaient bien sûr posséder le motif GxxPG mais également être spécifiquement produit par la CathS. Pour cela, nous avons utilisé les données issues des travaux de notre collègue C. Schmelzer ayant caractérisé un grand nombre d'élastase (180,194). Enfin, la tropoélastine étant produite au cours du remodelage vasculaire associé à l'IRC (374), les peptides sélectionnés devaient également pouvoir être produits à partir de ce substrat physiologiquement relevant.

Dans ces conditions, 4 EDPs ont retenus notre attention :

- VPGAVPGGVPGGVF (P1)
- GAVPGGVPGGVF (P2)
- GLGPGGFPGIG (P3)
- VKPGKVPGVG (P4)

P1 et P2 possèdent une séquence semblable mais P1 est un peu plus long. Ceci nous a également permis d'analyser l'influence de la longueur du peptide sur la bioactivité. P3 possède deux motifs GxxPG enchainés et P4 à la particularité rare de posséder une lysine dans le motif GxxPG dont le rôle dans ce motif et sa bioactivité n'ont jamais été étudiés.

Ces EDPs ont été synthétisés et leurs potentiels effets pro-calcifiants ont été évalués *via* la caractérisation de leur influence vis-à-vis de l'ostéodifférenciation des CMLs, cellules responsables des calcifications vasculaires médiales observées au cours de l'IRC.

C. Rôle des EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS sur les processus de calcifications vasculaires

1. Impact des EDPs sur l'ostéodifférenciation des CMLs

Les calcifications vasculaires observées au cours de l'IRC sont les principales complications retrouvées chez les patients et participent de façon importante au développement des événements cardiovasculaires associés. En particulier, elles augmentent la rigidité vasculaire, conduisant à une augmentation du risque d'infarctus du myocarde et à une perte progressive de la fonction rénale. Ces calcifications sont ainsi considérées comme un puissant facteur prédictif de mortalité (11,160).

Il est établi que le mécanisme à l'origine des calcifications vasculaires au cours de l'IRC consiste en l'ostéodifférenciation des CMLs vasculaires. Ces cellules acquièrent alors un phénotype ostéoblastique associé à l'augmentation de marqueurs spécifiques comme RunX2 ou l'ostéopontine ainsi qu'à une perte de protéines mésenchymateuses telles que SM22 et α -SMA (375). De plus, l'hyperphosphatémie associée à l'IRC a été montrée comme étant un inducteur puissant de cette ostéodifférenciation (163).

Les résultats présentés en amont dans ce manuscrit suggèrent que la CathS pourrait être produite par RAGE au cours de l'IRC, et que cette protéase a la capacité de libérer des EDPs potentiellement bioactifs. La corrélation entre l'expression de la CathS et la dégradation de l'élastine dans la survenue des calcifications vasculaires ayant été suggérée (30), nous nous sommes naturellement demandé si les EDPs produits par cette protéase pouvaient induire ou participer à l'ostéodifférenciation des CMLs. (228,376).

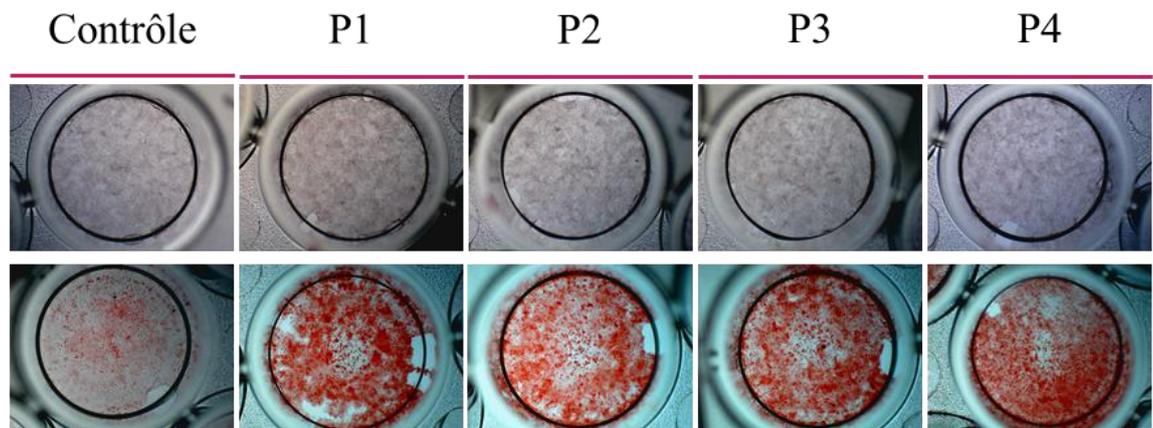
En s'appuyant sur l'ensemble de ces résultats, les EDPs sélectionnés ci-dessus ont été testés sur des CMLs en présence ou non de Pi, inducteur majeur des calcifications vasculaires, afin d'évaluer leur effet sur l'ostéodifférenciation de ces cellules dans des conditions retrouvées au cours de l'IRC.

Ainsi, les cellules MOVAS-1 ont été traitées pendant 7 jours avec du Pi seul (3mM), des EDPs seuls (P1 à P4) ou la combinaison des deux (P1P à P4P). Après fixation et coloration

des cellules avec du rouge alizarine, l'observation de la coloration des puits a été effectuée puis quantifiée.

Les photographies illustratives des différentes expériences révèlent une faible coloration avec le Pi seul alors que la combinaison avec les EDPs (P1P_P2P_P3P_P4P) produit une nette intensification de la coloration. Les conditions contrôles (milieu seul) et les EDPs seuls ne montrent aucune coloration visible (Figure 44A). Afin de quantifier avec précision cette coloration, un sous logiciel a été mis au point en collaboration avec le Dr Christine Terryn de la plateforme PICT de l'URCA permettant de déterminer le pourcentage occupé par la coloration par rapport à l'aire totale du puit. Après traitement, les données démontrent que le Pi induit une coloration recouvrant en moyenne 5 % de l'aire des puits analysés alors que 32 %, 36 %, 39 % et 32% de l'aire des puits est recouverte après traitement des CMLs avec P1P, P2P, P3P ou P4P respectivement, (Figure 44B). Ces résultats démontrent que les EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS en condition hyperphosphatémique accélèrent très significativement la mise en place des calcifications *in vitro*.

A)



B)

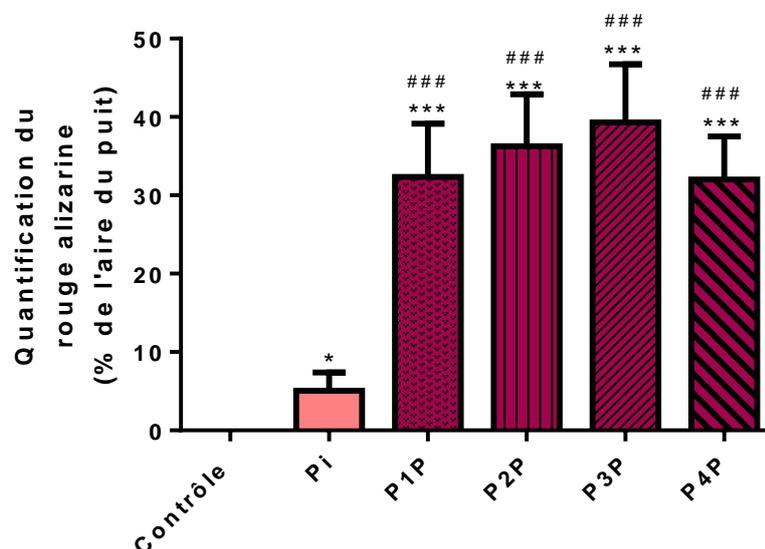


Figure 44 : Les EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS accélèrent les calcifications *in vitro* en conditions hyperphosphatémiques. **A)** : Les CMLs ont été traitées pendant 7 jours avec du Pi (3 mM) seul ou associé avec des EDPs produits par l'action de la CathS (200 µg/ml). Après fixation des cellules (PFA 4%) et coloration avec du rouge alizarine, les dépôts calciques apparaissent en rouge. **B)** : La coloration des puits est quantifiée grâce à un sous-logiciel utilisable sur ImageJ déterminant le pourcentage de l'aire du puits occupée par la coloration. $p < 0,01$ *** vs du contrôle. $p < 0,01$ ### vs du Pi. Les résultats présentent les données issues de 5 expériences indépendantes.

Afin de caractériser au mieux les changements phénotypiques associés, nous avons évalué différents marqueurs spécifiques. Nous nous sommes intéressé l'expression protéique de RunX2, un facteur de transcription régulant la différenciation ostéoblastiques des CMLs. Des études ont montré qu'il est à lui seul suffisant pour réguler cette différenciation et donc les calcifications vasculaires. En effet, sa délétion *in vivo* dans les CMLs inhibe le développement des calcifications vasculaires (377). De plus, les variations protéiques d'un marqueur

mésenchymateux, SM22 α ont été également analysés à la suite des différents traitements. C'est une protéine d'association du cytosquelette d'actine intervenant dans la migration et la contraction des CMLs (378). Dans des conditions pro-calcifiantes, la diminution de l'expression de ce marqueur de CMLs est associée au développement de calcifications *in vitro* (375). En parallèle, les changements transcriptomiques d'un marqueur tardif de cette ostéodifférenciation, l'ostéopontine (OPN) ont également été évalués après traitements cellulaire. L'OPN, protéine matricielle osseuse non collagénique (379), est exprimée notamment par les ostéoblastes, les CMLs et les chondrocytes. Elle présente une forte affinité pour le calcium ce qui lui permet d'interagir avec de l'hydroxyapatite. Son expression est élevée lorsque des CMLs sont traitées avec un milieu pro-calcifiant ou avec du sérum de patients urémiques induisant le dépôt de calcium *in vitro* (380).

Les analyses des Westerns blot ainsi que les RTqPCR ont été réalisés après un traitement des CMLs pendant 7 jours avec le Pi, les EDPs dérivés de l'activité de la CathS ou avec la combinaison des deux. L'évaluation protéique de deux marqueurs, RunX2 et SM22 α , a été réalisée par western blot. L'analyse densitométrique de western blot RunX2 montre que le Pi seul induit une faible tendance à augmenter l'expression de ce marqueur par au contrôle. Les mêmes résultats peuvent être observés avec les EDPs seuls. En ce qui concerne la combinaison Pi avec EDPs, une amplification significative de l'expression de RunX2 est observée par rapport à la condition Pi (augmentation de 82% pour P1P, de 40% pour P2P, de 73% pour P3Pet de 75% pour P4P). Ces résultats tendent à confirmer que les EDPs spécifiques de la CathS stimulent de façon importante l'ostéodifférenciation des CMLs en induisant une accélération de l'expression de RunX2 par rapport au Pi (Figure 45A). Par ailleurs, l'analyse protéique de SM22 α montre qu'elle est 3 fois moins exprimée dans la condition Pi seule par rapport aux conditions EDPs seul. Les conditions EDPs seuls présentent une expression égale à la condition contrôle. De manière intéressante, on observe que les conditions combinant Pi avec les EDPs présente une très faible quantité de SM22 α avec une diminution de 29%, 55%, 19% et de 15% pour P1P, P2P, P3P et P4P respectivement, par rapport à la condition Pi seul (Figure 45B).

L'analyse transcriptomique montre que l'expression de l'OPN est quasiment équivalente entre les conditions Pi et EDPs seuls. Dans la condition avec le milieu seul, une diminution de 1,5 fois est observée par rapport à la condition Pi seul. Enfin, la combinaison Pi et EDPs (P1P_P2P_P3P_P4P) entraîne une augmentation significative de l'expression de l'OPN qui est de 2 à 5 fois plus élevée comparée à celle observée dans la condition Pi seul. Ainsi, les CMLs en condition normale expriment très faiblement OPN. Il est en de même

lorsqu'elles sont traitées avec du Pi ou des EDPs seuls. Enfin l'association des deux conditions déclenche une amplification significative de l'expression de l'OPN comparée au Pi seul (Figure 45C). Ces résultats semblent démontrer que les EDPs accélèrent l'ostéodifférenciation des CMLs en condition hyperphosphatémique en induisant l'expression de protéines ostéoblastiques.

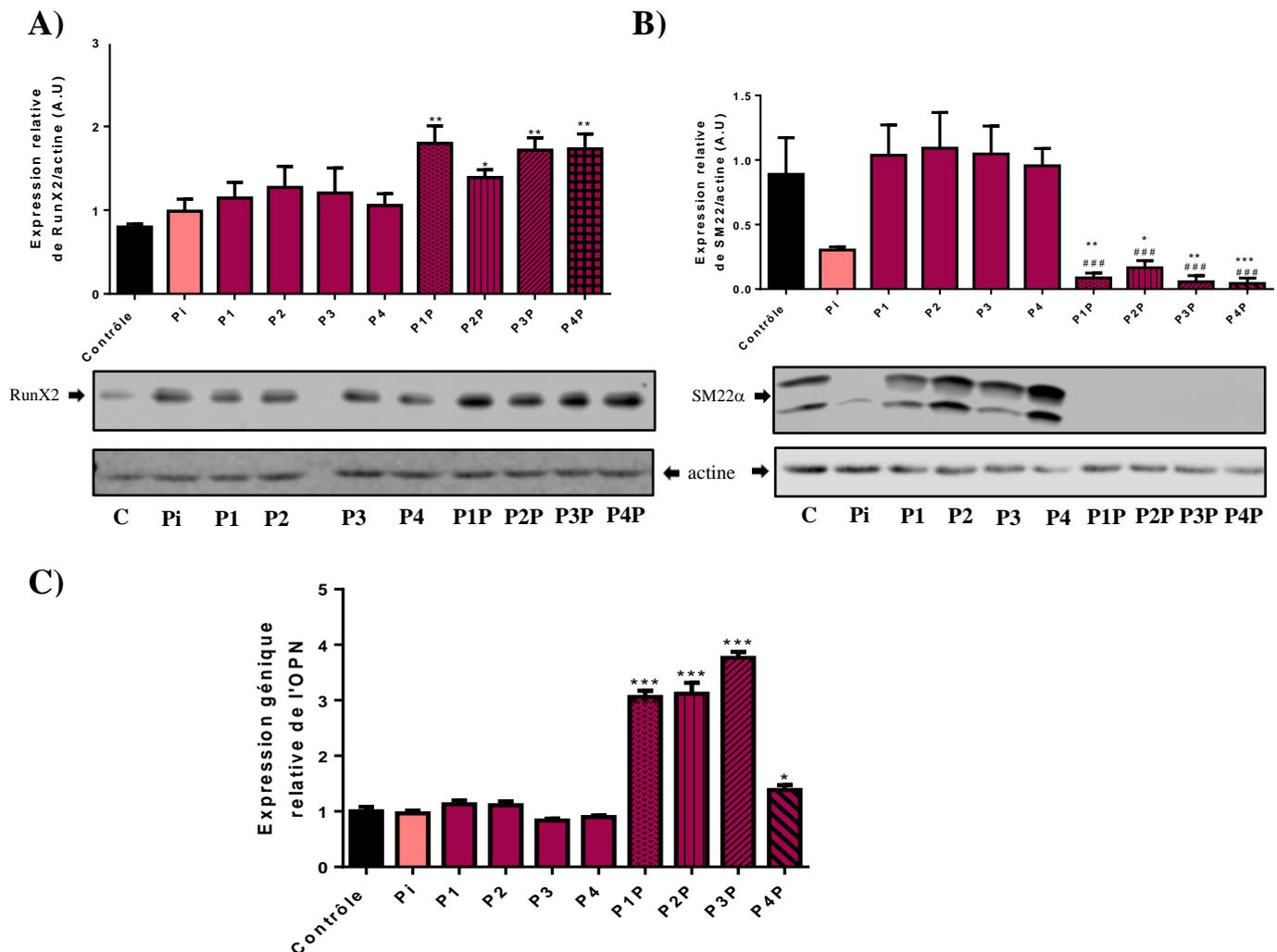


Figure 45 : Influence des EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS sur l'expression des marqueurs d'ostéodifférenciation et de CMLs. A) : Analyse protéique de l'expression de RunX2 après 7 jours de traitement des CMLs avec du Pi (3 mM) seul, des EDPs seuls (200 µg/ml) ou une combinaison des deux. **B) :** Analyse de l'expression protéique de SM22α après 7 jours de traitement avec du Pi (3 mM) seul, des EDPs seuls (200 µg/ml) ou une combinaison des deux. La densité des bandes a été déterminée grâce à l'utilisation du logiciel ImageJ a été rapporté à l'expression de l'actine. Les photographies des westerns blots de RunX2 et SM22α sont représentatives des résultats de 5 expériences indépendantes. La densité des bandes a été rapportée à l'expression de l'actine pour l'analyse de l'expression de RunX2 et SM22. **C) :** Analyse de l'expression transcriptionnelle de l'OPN après 7 jours de traitement avec du Pi seul (3 mM), EDPs seuls (200 µg/ml) ou la combinaison des deux conditions. L'expression est rapportée à 2 gènes rapporteurs, RPS26 et 36B4. $p < 0,05^*$, $p < 0,1^{**}$, $p < 0,01^{***}$ vs du contrôle. $p < 0,01^{###}$ vs de Pi.

Ainsi l'analyse de différents marqueurs d'ostéodifférenciation met en évidence que les EDPs, en condition hyperphosphatémique, sont impliqués dans l'ostéodifférenciation des CMLs en induisant de façon accéléré par rapport au Pi l'expression de marqueurs spécifiques comme RunX2 et OPN. En parallèle, cette association conduit également à une diminution plus sévère de SM22, marqueur spécifique de CMLs, que le Pi seul.

2. Le CRE, relais moléculaire impliqué dans les effets pro-calcifiants des EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS

2.1. Influence du DANA et de CS sur les calcifications induites par les EDPs sélectionnés

Les effets pro-calcifiants des EDPs soulèvent la question de l'implication du CRE. Afin de répondre à cette question, deux inhibiteurs ciblant différentes sous-unités du CRE ont été utilisés dans notre modèle *in vitro* d'ostéodifférenciation : le DANA, ciblant l'activité sialidase de Neu-1, sous-unité transductrice du signal, et le chondroïtine sulfate (CS), antagoniste de la liaison des EDPs sur EBP. Notre équipe a déjà démontré que ces inhibiteurs bloquent les effets dépendant des EDPs dans divers processus cellulaires et physiopathologiques (216,368).

Nous avons ainsi tout d'abord traité des CMLs pendant 7 jours avec les EDPs sélectionnés en condition hyperphosphatémique (200 µg/ml d'EDPs ; 3 mM Pi) en présence ou non de DANA (400 µM). Après l'arrêt des traitements et prises des photographies, les résultats montrent qu'en absence de l'inhibiteur, une forte coloration rouge dans les conditions P1P, P2P, P3P et P4P comparée aux conditions contrôle et Pi seul est observée, tels que nous l'avons décrit dans les figures précédentes (Figure 44). Une absence totale de coloration est observée en présence de DANA pour l'ensemble des traitements EDPs+Pi. Cependant, de manière surprenante, les puits contenant Pi sans EDPs montrent également une absence de coloration (Figure 46A). Ainsi, le DANA inhibe les processus EDPs-dépendant mais également ceux dépendants du Pi. Afin de confirmer l'implication du CRE, une seconde série de manipulations utilisant du CS (200 µg/ml) a été réalisée. Les conditions de traitement et de coloration qui ont été utilisées sont exactement les mêmes que celle utilisées pour le DANA. Les images montrent un fort marquage du rouge alizarine dans les conditions EDPs+Pi comparée à la condition Pi seul. La présence de CS induit une diminution sévère de ce marquage dans toutes les conditions, y compris Pi seul (Figure 46B).

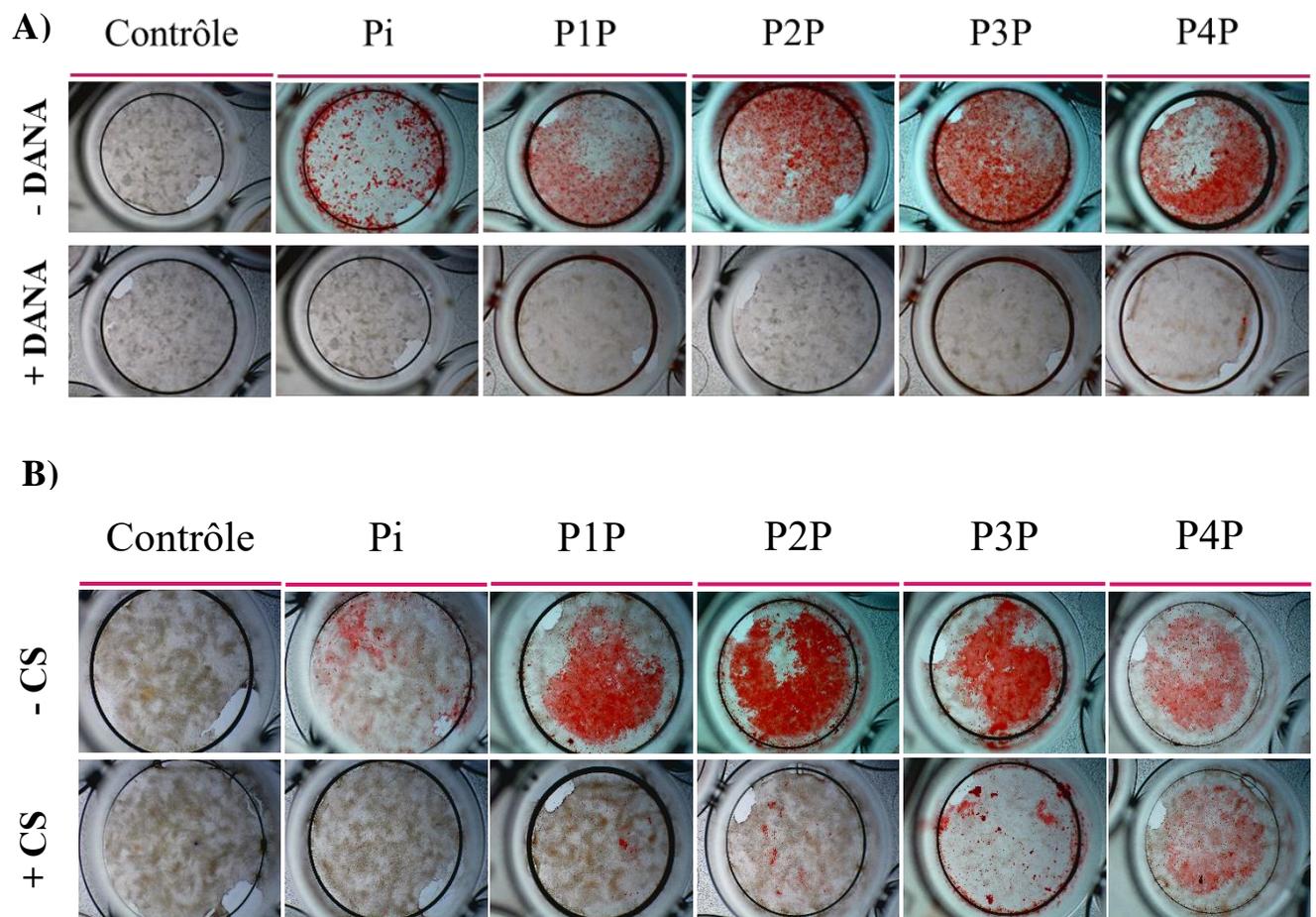


Figure 46 : Impact des différents inhibiteurs du CRE sur les calcifications *in vitro* induites par les EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS. **A)** : Les CMLs ont été traitées pendant 7 jours avec du Pi (3 mM) seul ou associé avec des EDPs produits par l'action de la CathS (200 µg/ml), en présence ou non de DANA (400 µM). Après fixation des cellules (PFA 4%) et coloration avec du rouge alizarine, les dépôts calciques apparaissent en rouge. **B)** : Les CMLs ont été traitées pendant 7 jours avec du Pi (3 mM) seul ou associé avec des EDPs produits par l'action de la CathS (200 µg/ml), en présence ou non de CS (200 µg/ml). Après fixation des cellules (PFA 4%) et coloration avec du rouge alizarine, les dépôts calciques apparaissent en rouge. Les résultats présentent les données issues de 5 expériences indépendantes.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'inhibition du CRE bloque les effets procalcifiants des EDPs mais aussi, de manière surprenante, ceux du Pi.

Il est important de noter que P4 a présenté sur l'ensemble des manipulations que nous avons réalisées, un caractère particulier, et ce de deux façons différentes. Dans certaines expériences menées, il n'a pas été en mesure d'augmenter le processus de calcification alors même que P1, P2 et P3 présentaient toujours cet effet. Lorsque c'était le cas, il est arrivé que DANA et CS se soient montrés incapables d'inhiber son effet sur l'ostéodifférenciation des CMLs, alors que cela était le cas pour les autres peptides. Ces dernières données suggèrent l'existence de deux processus, un CRE-dépendant et un autre, CRE-indépendant.

Afin d'expliquer ces états de fait, nous avons menés des études de relations structures/fonctions grâce à des méthodologies de modélisation moléculaire en collaboration avec le Pr Manuel Dauchez et le Dr Nicolas Belloy, UMR CNRS 7369 MEDyC. La première partie de cette étude moléculaire s'est intéressée à la structure des EDPs sélectionnés et à leur possible interaction avec l'EBP.

La seconde partie a évalué la capacité qu'au-delà d'induire le processus de calcification *via* le CRE, certains EDPs que nous avons testés et particulièrement P4 puissent constituer des zones de nucléation calcique et donc de calcification *via* un processus acellulaire. Ceci pourrait alors expliquer les cas où il a été observé de la calcification avec ce peptide mais que DANA et CS étaient sans effets.

2.2. Analyse des relations structure/fonction des EDPs sélectionnés

La capacité des EDPs sélectionnés de se lier à l'EBP a été étudiée à l'aide du logiciel d'amarrage moléculaire HADDOCK2.2 (381,382) dans sa version en ligne (<http://haddock.science.uu.nl/services/HADDOCK2.2/>). HADDOCK repose sur l'intégration et l'utilisation de données biochimiques, biophysiques ou bio-informatiques indiquant les résidus potentiellement engagés dans l'interaction entre le ligand et le récepteur. Ces informations sont traduites en contraintes de distance entre les deux partenaires. Au cours de la recherche (3 étapes), le logiciel cherche à satisfaire au maximum les contraintes entre les résidus censés être impliqués dans la formation du complexe.

La première étape consiste à générer des orientations aléatoires des 2 partenaires et à minimiser l'énergie d'interaction par un amarrage rigide. Au cours de cette étape, 1000 conformations sont générées et les 200 meilleurs complexes sont conservés pour l'étape suivante. La seconde étape consiste en 3 recuits simulés où les chaînes latérales puis les chaînes principales des résidus à l'interface sont progressivement relâchées. Les structures générées sont ensuite minimisées (200 pas). Enfin au cours de la dernière étape, une courte simulation de dynamique moléculaire est réalisée à 300K dans une couche d'eau explicite de 8Å afin de relaxer les résidus à l'interface ligand/cible. Les poses sont alors triées sur la base d'un score qui est une combinaison linéaire de différentes énergies (van der Waals, électrostatique, désolvatation et surface enfouie) dont les pondérations ont été optimisées pour chaque étape. Plus ce score est négatif, meilleure est la pose.

Les complexes générés lors de la dernière étape sont finalement regroupés en cluster : après avoir alignés les résidus à l'interface du récepteur, la *Root Mean Square Deviation* du *backbone* des résidus du ligand engagés dans les contacts intermoléculaires est calculé pour regrouper les poses. Il est important de noter que tout travail d'amarrage moléculaire nécessite une analyse manuelle des poses générées de façon à être sur des choix optimum intégrant l'ensemble des données utilisées.

La structure de l'EBP présentée utilise le modèle publié au sein de notre laboratoire lors de l'étude d'un autre EDP bioactif, l'hexapeptide VGVAPG (358). Les données générées lors de cette étude servent de référence et de point de comparaison aux données présentées dans ce travail. Il est parfaitement connu que l'interaction entre EBP et EDPs bioactifs nécessite le motif de xGxxPG conférant une structure en coude β de type VIII.

Il a également été identifié que 3 résidus du site de fixation de l'EBP sont essentiels et sont utilisés comme contraintes lors des expériences d'amarrage avec HADDOCK : E137, L103 et R107 (Figure 47). Dans ce modèle d'interaction, le glutamate 137 et l'asparagine 107 stabilisent le peptide dans la cavité *via* ses extrémités chargées.

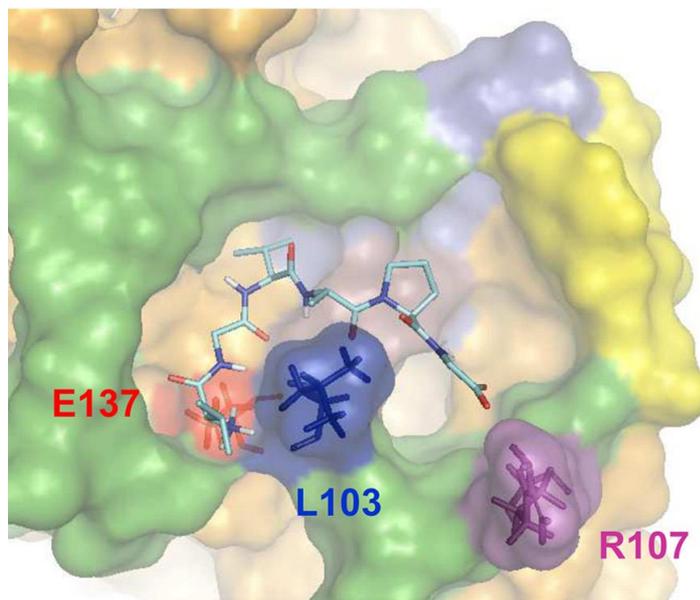


Figure 47 : Modèle de docking du VGVAPG sur l'EBP utilisé pour l'étude des interactions EDPs sélectionnés/EBP. Le peptide VGVAPG, situé dans la poche définie par la séquence V32 (vert), est représenté par des bâtons. Les trois résidus stabilisant l'interaction sont colorés en rouge (E137), bleu foncé (L103) et violet (R107). D'après Blanchevoye et al, 2013 (358)

Du fait du nombre de élevés de degrés de liberté (torsions le long de la chaîne principale), les EDPs retenus dans ce travail sont trop longs pour mener à bien des expériences exhaustives d'amarrage moléculaire échantillonnant suffisamment de possibilités. Les EDPs utilisés dans cette partie du travail ont donc été réduits à la séquence xGxxPG potentiellement active, appelées S1 à S4, soient :

- pour P1 et P2 : PGAVPG et PGGVPG ($\overline{\text{VPGAV}}\overline{\text{PGGVPG}}\text{GVF}$)
- pour P3 : PGGFPG ($\text{GLG}\overline{\text{PGGFPG}}\text{IG}$)
- pour P4 : PGKVPG ($\text{VK}\overline{\text{PGKVPG}}\text{VG}$)

La première étape a alors été de vérifier la capacité de HADDOCK à reproduire la pose de référence du VGVAPG. Ensuite, le score de la meilleure pose de ce ligand a été évalué. Enfin, les séquences dérivées des EDPs ont été étudiées le protocole établi pour le VGVAPG, en conservant les extrémités chargées.

L'analyse des meilleurs clusters des EDPs sélectionnés dans le site de fixation de l'EBP avec le modèle du VGVAPG en arrière-plan, démontre que leur conformation est semblable à celle du peptide de référence et donc compatible à une liaison avec le récepteur (Figure 48). En effet, ces hexapeptides " s'enroulent " autour du résidu hydrophobe L103 et leurs extrémités N- et C-terminales interagissent avec les résidus E137 et R107, respectivement, dont l'orientation permet la mise en place de liaisons électrostatiques, tel que c'est le cas pour VGVAPG.

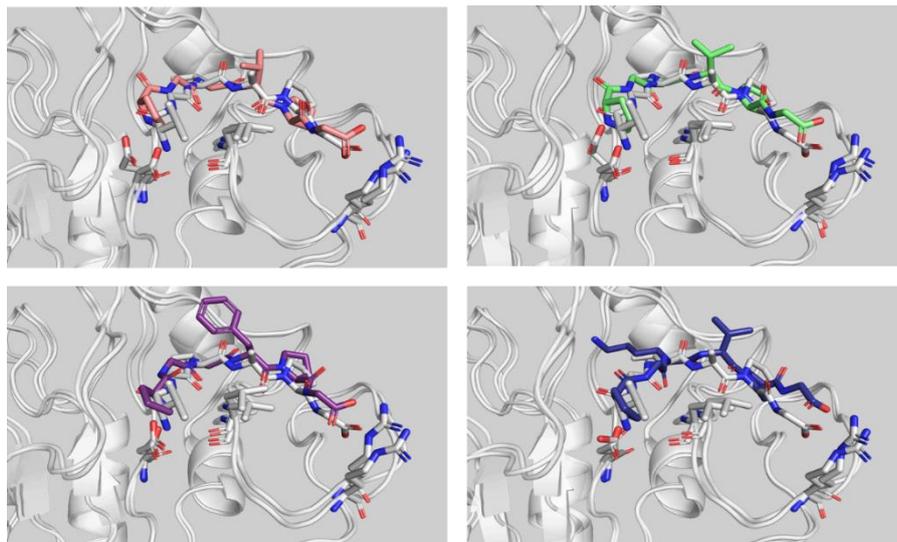


Figure 48 : Visualisation de l'interaction des EDPs sélectionnés dans le site de fixation de l'EBP. Représentation de l'interaction entre l'EBP et S1 (rose), S2 (vert), S3 (violet) et S4 (bleu). Le VGVAPG est en gris.

Les données obtenues montrent que S1, S2 et S3 ont un score HADDOCK proche de celui de VGVAPG, peptide de référence dans cette étude dont l'interaction avec l'EBP a déjà été validée. En effet, un score de -68,6 pour S1, de -66,6 pour S2 et de -71,2 pour S3 ont été obtenus comparés à -70,4 pour le VGVAPG. Les meilleures poses du S4 présentent les scores les plus faibles des 4 séquences. Cependant, un grand nombre de poses ne sont pas satisfaisantes avec un peptide qui reste fortement exposé au solvant et n'est donc pas correctement arrimé dans le site. Ce comportement peut s'expliquer par la présence de la lysine en position 3, l'augmentation des degrés de liberté liés à la longueur de la chaîne latérale et les effets de charges induits, ce qui compliquent la génération de poses pertinentes. Une analyse manuelle fine des résultats montre que notamment dans le 7^{ème} cluster, HADDOCK a regroupé des poses très différentes les unes des autres, avec une dispersion du score HADDOCK autour de la valeur moyenne de ce cluster. Cependant, l'une d'entre elle répond aux critères qui satisfont la liaison d'un xGxxPG dans l'EBP. Cette pose a été affinée et réévaluée au cours de la seule étape de dynamique moléculaire dans l'eau du protocole HADDOCK. Cet affinement améliore fortement le score de la pose (-94,5) et montre que le S4 est un très bon candidat à la liaison à l'EBP dont il peut être difficile de prédire les effets (Tableau 4).

	Blanchevoye et al, 2013		PGAVPG	PGGVPG	PGGFPG	PGKVPG		
	VGVAPG docking	VGVAPG score seul	S1	S2	S3	S4 1 ^{er} cluster	S4 7 ^{ème} cluster	S4 optimisé
Score HADDOCK	-70,4 ± 2,3	-74,2 ± 1,4	-68,6 ± 3,2	-66,6 ± 3,4	-71,2 ± 4,5	-64,5 ± 2,9	-43,3 ± 12,9	-94,5 ± 0,8
Taille des cluster	73	200	92	61	30	36	7	200

Tableau 4 : Tableau de score HADDOCK reflétant les résultats obtenus par docking moléculaire

La probabilité d'interaction entre S4 (et donc P4) et EBP est statistiquement plus faible que pour S1, S2 et S3 (et donc P1, P2 et P3), pouvant expliquer le fait que P4 n'est pas toujours capable d'induire une ostéodifférenciation CRE-dépendante.

Dans un second temps, nous avons également analysé si une interaction était possible entre les EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS et le calcium. En effet, comme décrit auparavant dans le paragraphe I_B_2.2.5.2, la dégradation de l'élastine induit un changement de polarité de cette molécule augmentant son affinité pour le calcium. Cela forme des sites de nucléation le long de fibres élastiques favorisant le développement de calcifications

vasculaires (233). Pour cela, une matrice d'hydroxyapatite (HAP) a été utilisée pour explorer le comportement des EDPs vis à vis des surfaces de calcium préformées. La difficulté majeure relève de la disponibilité de paramètres pertinents. Heinz et coll. ont développé un champ de forces et des surfaces modèles (INTERFACE-FF (383)) dédiés à l'étude de nanostructures, dont l'hydroxyapatite (384), telles que les minéraux, les métaux ou les biopolymères. Les paramètres de ce modèle ont fait l'objet d'un affinement et d'une validation expérimentale (effets du pH, faces et plans de coupe dans le cristal d'hydroxyapatite) et sont compatibles avec la plupart des champs de forces (paramètres) utilisés classiquement en simulation. Le modèle d'hydroxyapatite établi par Lin *et al* (384) se présente sous la forme d'une surface élémentaire (face {001} du cristal) de 3,7 x 3,3 x 12,7 nm que nous avons adaptée à la dimension des EDPs pour obtenir une surface de 7,5 x 6,5 nm. Une fois la surface construite, l'EDP est placé dans la boîte de façon à ce qu'il ne soit pas en contact initial avec la surface. Chaque système EDP + HAP est ensuite solvate puis neutralisé par ajout d'ions Na⁺ et Cl⁻, pour une concentration de 0,1 molaire. Les simulations sont réalisées à l'aide du logiciel de dynamique Gromacs-2018.4 en utilisant le champ de forces CHARMM en suivant les paramètres de Lin et Heinz. Ainsi, afin de préserver la géométrie de la surface, des contraintes de position sont appliquées sur les calciums et les phosphates.

Lorsque l'on mesure la distance entre l'EDP et la surface, les données issues des simulations montrent que P1 et P4 possèdent la capacité d'interagir rapidement (<20ns et <30ns respectivement) avec l'hydroxyapatite comparativement à P2 et P3. Cette interaction est conservée tout au long de la durée simulée (125 ns) (Figure 49). P2 et P3 établissent des contacts ponctuels qui laisse l'EDP évoluer librement dans la boîte de simulation.

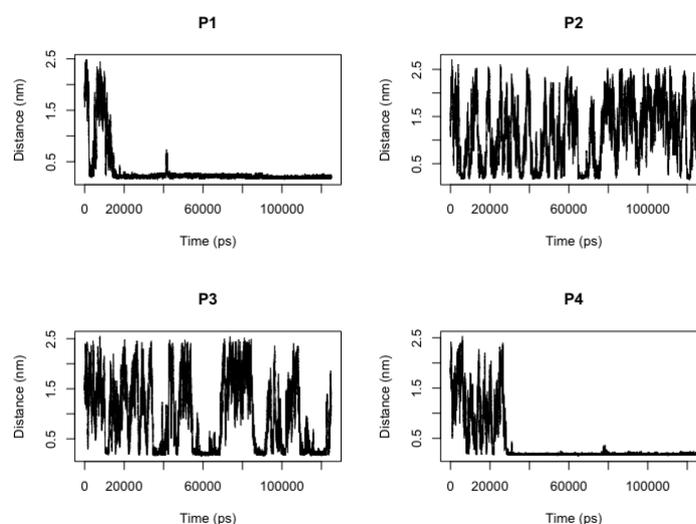


Figure 49 : Évaluation de la distance entre les EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS et un modèle d'hydroxyapatite par dynamique moléculaire

L'ensemble de ces observations laissent à penser alors que seuls P1 et P4 sont capables d'établir des liaisons sur une longue durée avec de l'hydroxyapatite.

Pour confirmer ces résultats, les énergies d'interaction décomposées en contribution coulombienne (liée aux effets de charge) et Lennard-Jones (liée au rayon de van der Waals des atomes) ont été déterminées entre l'hydroxyapatite et chaque EDPs sur les 25 dernières nanosecondes de simulation. Il ne s'agit en aucun cas d'une quantification de l'affinité ou de l'énergie de liaison qui demanderait l'utilisation de méthode de plus haut niveau.

Les résultats montrent que les énergies les plus favorables, c'est à dire les plus négatives, et donc les plus favorables à une interaction, sont observées pour P1 avec une énergie de -300 kJ/mol. P4 présente également une énergie de liaison faible entre -300 et -500 kJ/mol. P2 et P3 étant très peu en contact avec la surface d'hydroxyapatite, les énergies mesurées oscillent entre 0 (pas de contacts) et -100 kJ/mol ce qui est faible comparé aux peptides P1 et P4 (Figure 50).

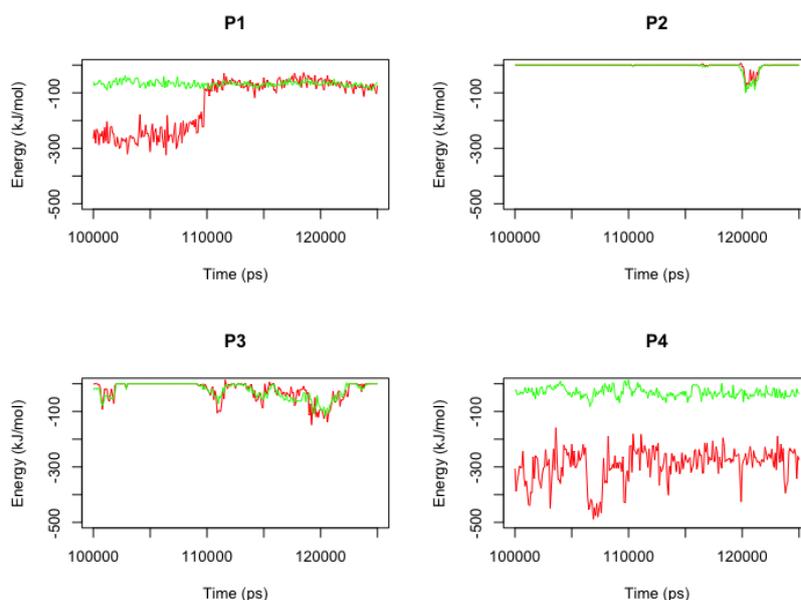


Figure 50 : Détermination de l'énergie de liaison avec un modèle d'hydroxyapatite pour chaque EDP. Les différents graphiques représentent les différentes énergies de liaisons pour chaque EDPs analysés. Les courbes vertes indiquent l'implication de liaisons de type Lennard-Jones et les courbes rouges symbolisent les liaisons coulombiennes.

L'ensemble de ces données démontre, sur les durées simulées, la propension plus importante des peptides P1 et P4 à interagir avec des surfaces préformées contenant un calcium. Ces expériences de dynamique moléculaire soutiennent l'hypothèse que P4 pourrait servir de

site de nucléation pour engager le développement de calcifications vasculaires le long des fibres élastiques, dans un processus acellulaire et donc indépendant du CRE, tel qu'observé dans certains cas et décrit ci-dessus. Il est bien sûr important de rappeler que ces processus de nucléation doivent également engager une concentration élevée de phosphate afin de générer des cristaux d'hydroxyapatite, telle que celle que nous avons utilisé dans nos expérimentations *in vitro*. Il est de plus intéressant de voir que P1 pourrait également se comporter comme P4, bien que nous ne l'ayons pas observé, certainement dû à sa propension à interagir fortement avec EBP qui pourrait être sa cible prioritaire.

3. Impact des EDPs sélectionnés sur la survenue de calcifications vasculaires *ex vivo* et *in vivo*

3.1. Impact des EDPs sélectionnés sur la survenue de calcifications *ex vivo*

La mise au point et l'utilisation du modèle cellulaire de calcification *in vitro* présenté ci-dessus a permis d'identifier les effets amplificateurs des EDPs dérivés de l'activité de la CathS sur les mécanismes d'ostéodifférenciation. Néanmoins, ce modèle d'étude reste un modèle très simplifié présentant de nombreuses imperfections tels que l'absence de communication intercellulaire ou encore le rôle que pourrait jouer d'autres composants matriciels. Par conséquent, un modèle plus complexe *ex vivo* utilisant des anneaux aortiques a alors été utilisé afin de confirmer l'effet potentialisateur des EDPs sur les calcifications vasculaires en présence d'une concentration élevée de Pi. Pour cela, des anneaux aortiques préparés à partir d'aortes de souris C57BL/6J ont été traités pendant 5 jours avec des EDPs seuls (200 µg/ml), du Pi seul (3 mM) ou une combinaison des deux. Après fixation des anneaux aortiques à l'aide de PFA et inclusion en paraffine, les calcifications ont été mises en évidence par une coloration Von Kossa faisant apparaître les dépôts calciques en noirs. Les résultats montrent un très faible marquage lorsque les anneaux aortiques ont été stimulés avec du Pi seul, les EDPs seuls n'en présentant

aucun. Les traitements combinant EDPs et Pi montrent quant à eux un marquage important (Figure 51).

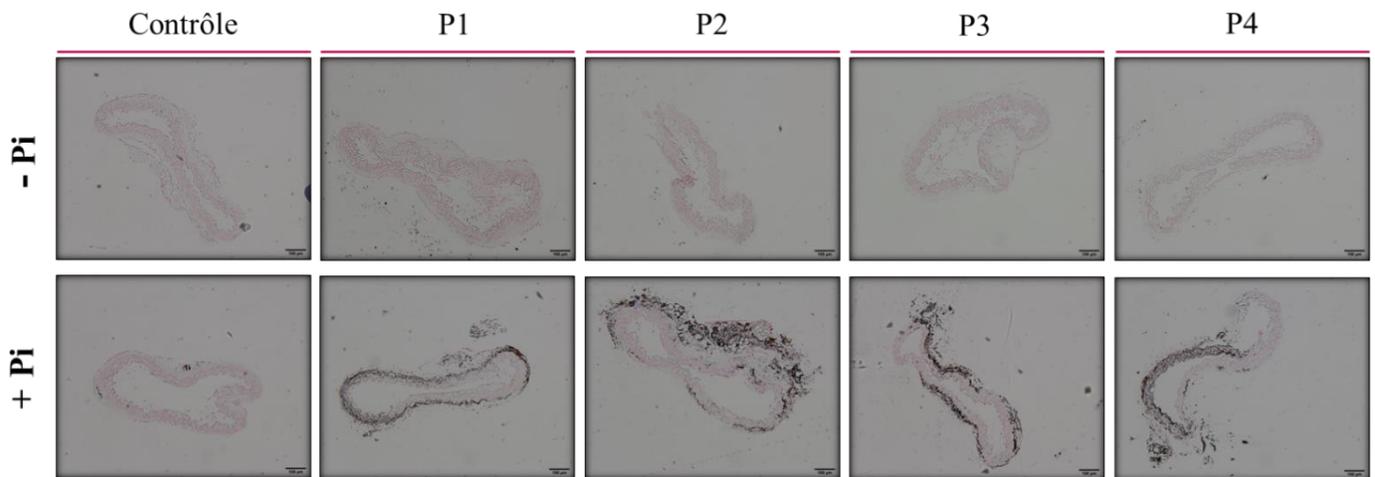


Figure 51 : Analyse des effets pro-calcifiants des EDPs provenant de l'activité élastolytique de la CathS dans un modèle *ex vivo* d'anneaux aortiques. Les anneaux aortiques ont été obtenus à partir d'aorte de souris C57BL/6J âgées de 8 semaines. Après un traitement de 5 jours avec les différentes conditions (Pi 3 mM, EDPs 200 µg/ml), les calcifications vasculaires ont été révélées à l'aide du marquage Von Kossa. Les images ont été obtenues grâce à l'utilisation du microscope Olympus BX51WIF sous un grossissement x10. Barre d'échelle : 100µm. (n=9)

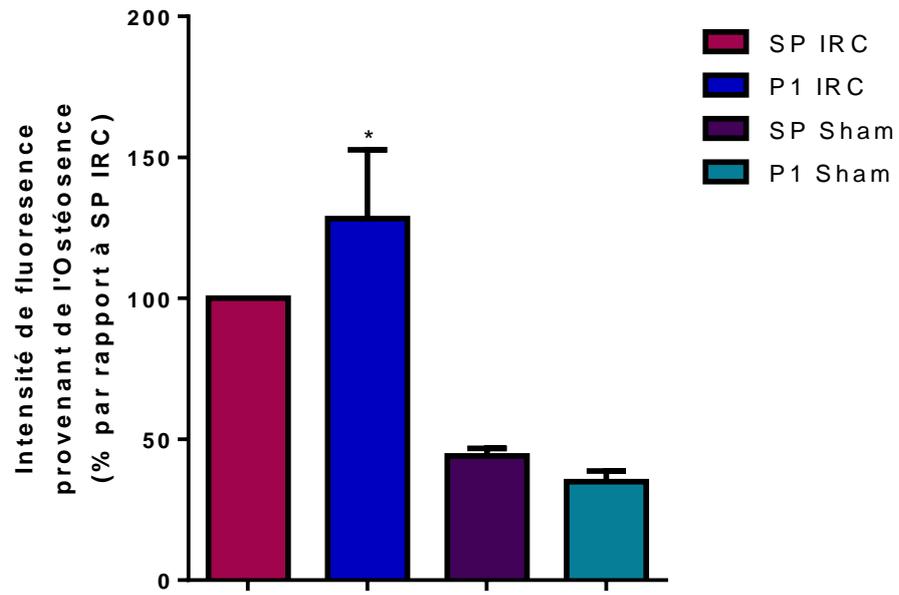
Ces observations montrent que les effets potentialisateurs des EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS sont également retrouvés dans un modèle *ex vivo* plus représentatif de la réalité physiologique.

3.2. Impact des EDPs sélectionnés sur la survenue de calcifications *in vivo*

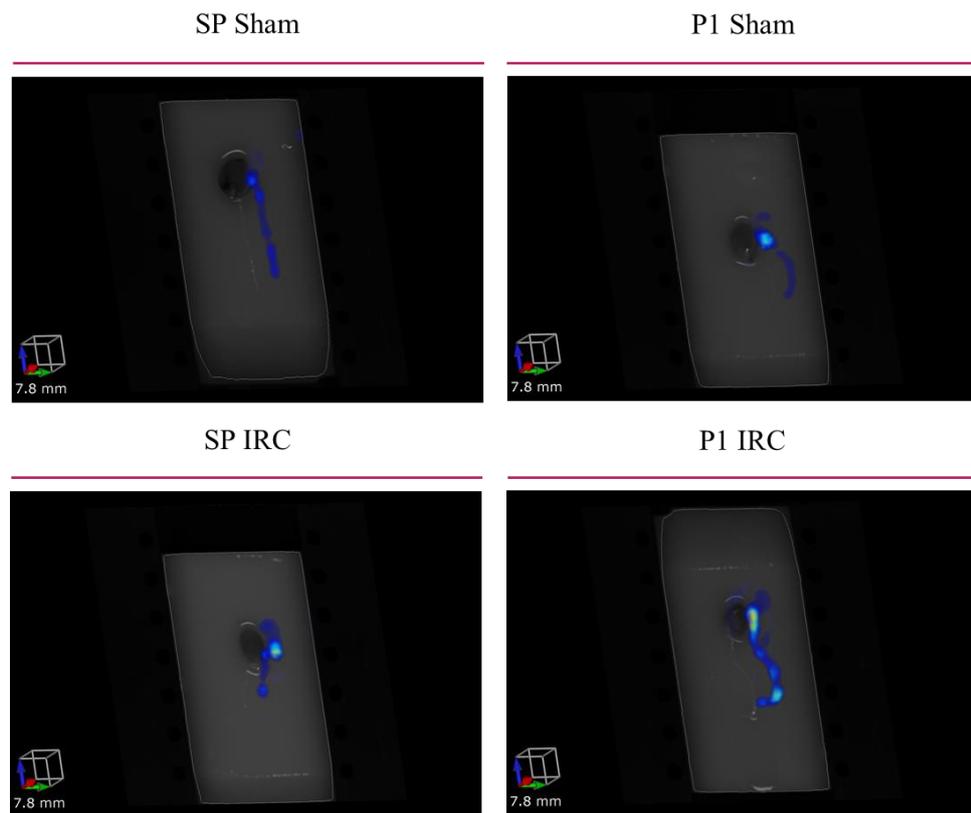
Nos études *in vitro* et *ex vivo* ont révélé que les EDPs spécifiques de la CathS possèdent un rôle pro-calcifiant dans les conditions d'hyperphosphatémie retrouvées au cours de l'IRC. Afin de compléter ces études, il était nécessaire de réaliser une dernière validation en conditions *in vivo* en utilisant un modèle murin d'IRC. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés pour des considérations éthiques, et sachant que les différents peptides dérivés de l'activité élastolytique de la CathS se sont montrés prompts à amplifier fortement les calcifications, notre choix s'est orienté vers P1 qui a de plus montré la meilleure reproductibilité lors de nos études *in vitro* et *ex vivo* et pour qui les données *in silico* ont révélé une forte probabilité d'interaction avec le CRE, mais également avec le calcium. Le peptide P1 a été administré tous les 3 jours à notre modèle de souris ApoE^{-/-} urémiques, 2 semaines post-chirurgie, à une concentration de 20 mg/kg, concentration bioactive d'EDPs classiquement utilisé *in vivo* (191). Après 17

semaines de traitement, la sonde Ostéosense a été utilisée afin d'évaluer *in vivo* par FMT l'impact de P1 sur l'évolution des calcifications vasculaires. Après récupération du signal, une zone d'intérêt a été déterminée afin de quantifier la fluorescence dans un même volume pour chaque sujet ce qui permet de comparer les conditions entre elles. La quantification de la fluorescence montre une augmentation des calcifications de 28% lorsque P1 a été administré (P1 IRC) comparativement au contrôle sérum physiologique (SP IRC). De plus, des contrôles "non IRC" ont été réalisés (SP Sham, P1 Sham) et démontrent comparativement à la condition SP IRC un faible signal Ostéosense et aucun effet de P1 en conditions non hyperphosphatémiques (-55% et -66% respectivement) (Figure 52A). Afin de caractériser au mieux l'effet de P1 et pour palier au problème d'atténuation du signal induit par la présence de tâche sur le corps des souris que nous avons utilisé pour ces expériences, l'arbre vasculaire (la crosse aortique et l'aorte) avec le cœur ont été extraits et placés dans le FMT. Les images obtenues représentent la fluorescence détectée au sein du système vasculaire avec une coloration convergeant vers le rouge au fur et à mesure que la fluorescence est importante (Figure 52B). Après avoir établi la zone de quantification à appliquer à l'ensemble des sujets, l'analyse de la fluorescence semble démontrer que P1 amplifie en conditions d'IRC les calcifications de 54% comparativement aux sujets contrôles. Les conditions Sham, quant à elles, montrent toujours une plus faible intensité de fluorescence et aucun effet de P1 (Figure 52C).

A)



B)



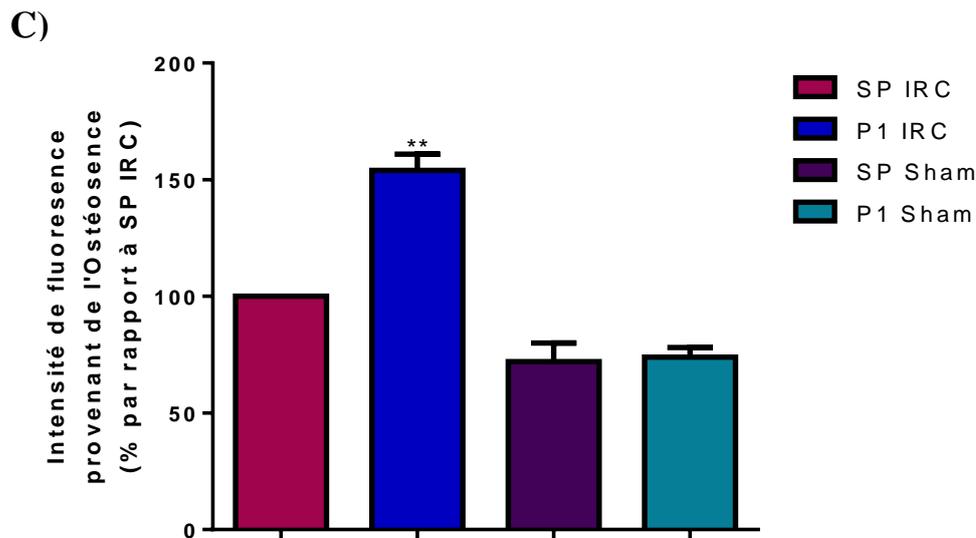


Figure 52 : Analyse des effets de P1 sur le développement des calcifications vasculaires *in vivo*.

A) Quantification de la fluorescence *in vivo* provenant de la sonde Ostéosense après 17 semaines de traitement. Après détermination d'une zone d'intérêt, la fluorescence a été quantifiée dans chaque groupe. B) Images représentatives de la fluorescence *ex vivo* provenant de la sonde Ostéosense après extraction de l'arbre vasculaire. Après récupération du signal, les images ont été obtenues. L'importance du signal est indiquée par une variation de couleur, la fluorescence étant d'autant plus élevée que la couleur rouge apparaît. C) Quantification des images obtenues en B). La détermination d'une zone d'intérêt superposable à l'ensemble des sujets permet de quantifier la fluorescence dans un même volume et donc de comparer les différentes conditions expérimentales. $n = 9$.
 $p < 0,05^*$, $p < 0,1^{**}$

Par conséquent, l'ensemble des données *in vivo* confirment qu'un EDP dérivé de l'activité de la CathS, présente un effet accélérateur de P1 sur la mise en place des calcifications *in vivo*. Ainsi, l'ensemble des données *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* que nous avons obtenus confirment clairement le rôle pro-calcifiant des EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS au cours de l'IRC.

Afin de terminer l'exploration du lien entre CathS et production EDPs bioactifs, nous nous sommes intéressés à un dernier point. Il a clairement été montré que les EDPs produits suite à l'action de diverses élastases telles que l'élastase leucocytaire, l'élastase des neutrophiles, la MMP-2 ou la MMP-9 (225,385) pouvaient induire une surexpression de ces mêmes protéases, créant un "cercle vicieux" vis à vis de leur production. Nous nous sommes ainsi posé la question concernant la CathS et avons évalué *in vivo* la conséquence de l'injection de P1 aux modèles animaux utilisés dans le paragraphe précédent sur la production de CathS, puis par des CMLs en culture.

4. Étude de l'influence de P1 sur l'expression de la CathS : existence d'une boucle d'amplification

Le développement de calcifications vasculaires stimulées par des EDPs laisse supposer d'une production d'EDPs pro-calcifiants en continu. Ceci serait alors possible par une libération continue d'élastases telle la CathS permettant le maintien de la dégradation progressive des fibres élastiques. Nous avons tout d'abord évalué cela *in vivo*, la CathS ayant été dosée dans le sérum des souris ApoE^{-/-} urémiques ou non recevant tous les 3 jours le peptide P1 à raison de 20mg/kg. Après 17 semaines, un prélèvement de sang rétro-orbital a été réalisé avant le sacrifice des souris afin de récupérer le sérum dans lequel la présence de CathS a été évaluée à l'aide d'un kit ELISA spécifiquement dédié. Après analyse, les résultats montrent que l'injection de P1 en conditions IRC induit une augmentation de la CathS de 44% comparativement au contrôle IRC, les taux dans les souris Sham étant beaucoup plus bas (- 30% pour les SP Sham et - 23 % pour les P1 Sham comparativement à SP IRC). P1 ne présente pas d'effet amplificateur sur l'expression de cette protéase en condition non urémique (Figure 53).

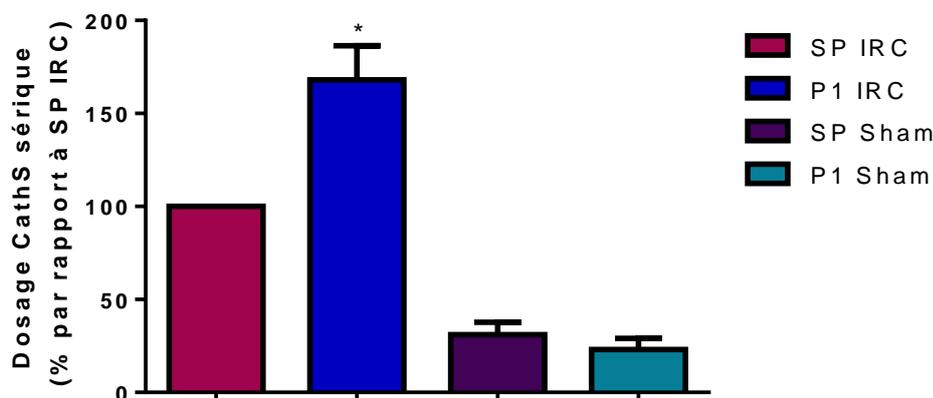


Figure 53 : Dosage sérique de la CathS. Après 17 semaines d'urémie, les sérums de souris ApoE^{-/-} IRC traitées avec P1 (20mg/kg), ou avec une solution de sérum physiologique, mais également ceux des contrôles Sham ont été récupérés. La CathS circulante a été dosée à l'aide d'un kit ELISA spécialement dédié. n =9. p < 0,05*

Dans le but de confirmer cela et d'évaluer le rôle des CMLs dans ce processus, des MOVAS-1 ont été traitées avec du Pi à 3mM, avec P1 (200µg/ml), ou une combinaison des deux. Après 48h, l'expression de la CathS a été détectée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-CathS révélé par un anticorps secondaire couplé Alexa-Fluor 568 nm. La fluorescence a été détectée à l'aide d'un microscope confocal rapide AxioObserver (Zeiss) et la quantification a été réalisée grâce à la mise au point d'un sous-programme utilisable sur le

logiciel ImageJ. Les images obtenues montrent un signal rouge spécifique de la CathS dont l'intensité est plus importante dans les conditions P1 comparée aux CMLs sans traitement spécifique. De manière intéressante, le traitement Pi, présent pour simuler l'environnement hyperphosphatémique associé à l'IRC, induit également une augmentation de l'expression de CathS (Figure 54A). La quantification de la fluorescence montre ainsi une augmentation de l'expression de cette protéase de 42% avec le Pi et de 38% avec P1 par rapport à la condition contrôle (Figure 54B).

Ces résultats confirment ainsi que P1 est capable d'induire l'expression de la CathS par les CMLs. Ceci valide l'hypothèse selon laquelle les EDPs pourraient être à l'origine d'une boucle d'amplification favorisant la sécrétion de CathS, ce qui maintiendrait la production d'EDPs pouvant participer à l'accélération du développement des calcifications vasculaires.

En conclusion de cette partie, nous avons mis en évidence un rôle pro-calcifiant des EDPs dérivés de l'activité élastolytique de la CathS dans les conditions hyperphosphatémiques retrouvées au cours de l'IRC. Par ailleurs, l'utilisation de divers inhibiteurs et de méthodologies de modélisation moléculaire a permis d'identifier le CRE comme relais moléculaire responsable de leur effet pro-calcifiant. De plus, certains peptides, tels que P4, pourraient également constituer des zones matricielles de nucléation pour les calcifications. Enfin, ces EDPs pourraient également être impliqués dans une boucle d'amplification de ces phénomènes en soutenant l'expression de la CathS.

L'ensemble des résultats présentés jusqu'ici a démontré l'existence au cours de l'IRC d'un axe RAGE / CathS / EDPs / calcifications. Ceci nous a permis de mieux comprendre le rôle de RAGE dans ces processus *via* son implication dans la production de CathS et l'élastolyse, ces deux acteurs étant centraux dans les phénomènes d'ostéodifférenciation associés à cette pathologie. En effet, nous avons montré pour la première fois par des approches combinées *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, que les EDPs libérés au cours de l'élastolyse induite par la CathS, jouent un rôle capital dans les processus d'ostéodifférenciation par leur interaction avec le CRE au cours de l'IRC.

Ce récepteur pourrait alors constituer une cible pharmacologique d'intérêt afin de lutter contre les calcifications vasculaires. Par conséquent, le dernier axe de ce travail de thèse visait à étudier le CRE comme cible thérapeutique innovante dans le traitement des calcifications médiales observées au cours de l'IRC.

D. Étude préliminaire du ciblage pharmacologique de Neu-1 au cours de l'IRC

Nous avons montré que notre modèle d'IRC présentait de larges plages d'élastolyse, synonyme de production d'EDPs endogènes (A.2, Figure 39) pouvant participer au processus de calcification *in vivo*, constituant un modèle proche des conditions physiopathologiques

réelles. Dans le but d'essayer de bloquer les effets des EDPs endogènes médiés par le CRE, notre stratégie s'est orientée vers l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de Neu-1, sous unité catalytique du CRE, en utilisant le Tamiflu®. En effet, il a été démontré que ce traitement antigrippal avait la capacité de bloquer de façon spécifique cette sialidase (386) et s'est par exemple révélé un agent anti-cancéreux très efficace agissant sur les processus de survie cellulaire dans le cadre du cancer du pancréas (387). Par ailleurs, il a été démontré que le blocage de la sous-unité catalytique du CRE engendre une inactivation des voies de signalisation et donc inhibe les effets biologiques associés (Figure 55). Enfin, cette molécule possédant une autorisation de mise sur le marché depuis de nombreuses années, toutes les études associées (toxicologie, tératogénèse, pouvoir mutagène, biodisponibilité...) ont d'ores et déjà été menées.

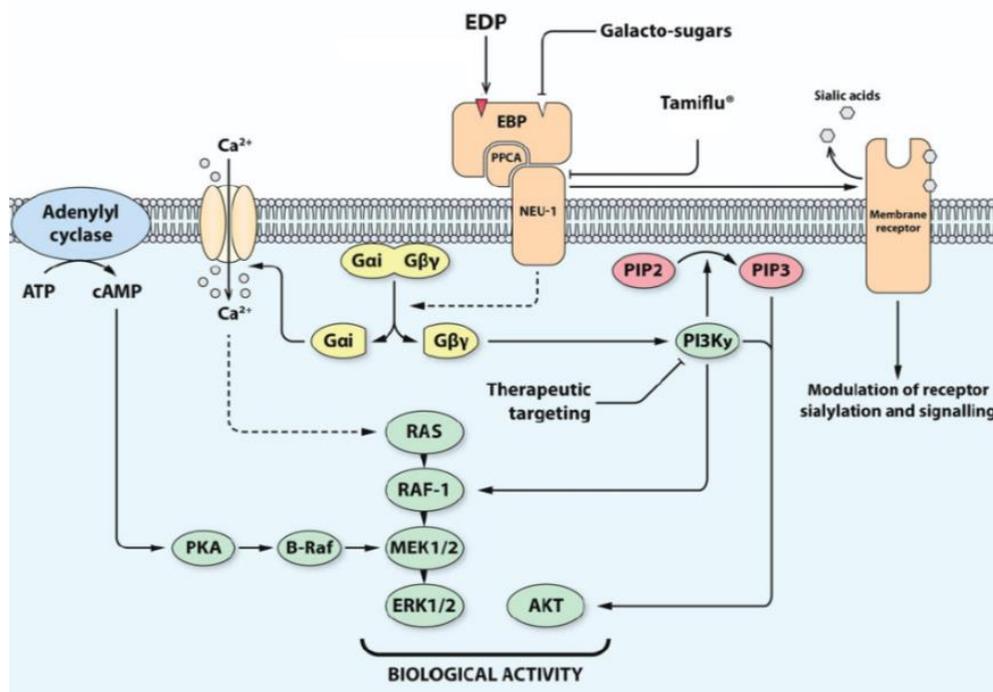


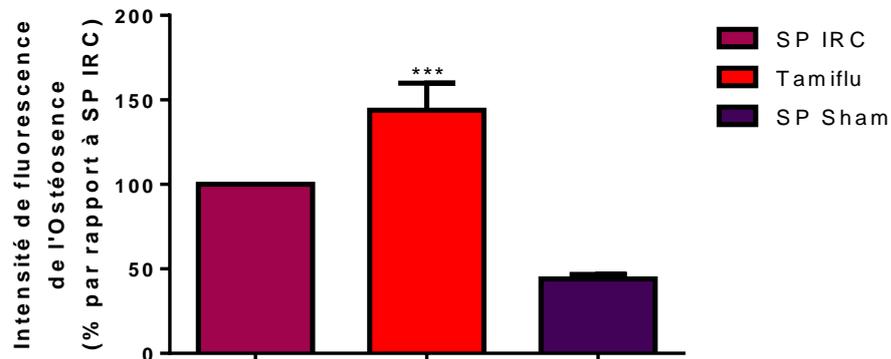
Figure 55 : Schéma illustratif de l'inhibition de Neu-1 par le Tamiflu® et conséquence sur les activités signalétique et biologique associées. Le Tamiflu® a été décrit comme étant un inhibiteur spécifique de la sous-unité transductrice Neu-1 du CRE, empêchant l'activation de voies de signalisation et supprimant alors les effets biologiques en aval (388).

Cette étude a été réalisée à l'aide de notre modèle murin d'IRC recevant tous les trois jours une injection de Tamiflu® (50mg/kg), ou une solution contrôle de sérum physiologique (SP). Nous avons ainsi évalué différents paramètres physiopathologiques auxquels nous nous sommes intéressés dans ce travail de thèse : les calcifications vasculaires, la production de

CathS, mais également la rigidité artérielle et le rythme cardiaque, altérés au cours de l'IRC (389,390).

L'étude de l'impact du Tamiflu® sur les calcifications vasculaires associées à l'IRC a été réalisée par l'utilisation de la sonde Ostéosense et de la FMT après 17 semaines. Après récupération du signal, une zone d'intérêt commune a alors été établie afin de pouvoir comparer les sujets entre eux. De manière très surprenante, la quantification de la fluorescence montre une augmentation relative de 43% des calcifications à la suite des traitements avec le Tamiflu® comparée aux souris contrôles SP IRC. Les souris Sham montrent deux fois moins de calcifications que les souris SP IRC (Figure 56A). L'analyse *ex vivo* de l'arbre vasculaire entier (Figure 56B) confirme cette tendance, une hausse de 68% de la fluorescence étant observée pour les sujets traités avec le Tamiflu® comparé à SP IRC (Figure 56C).

A)



B)



C)

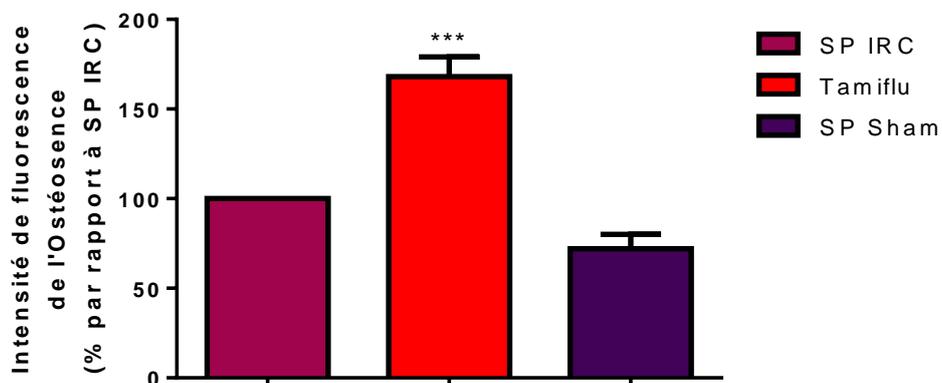


Figure 56 : Impact du Tamiflu® sur le développement des calcifications vasculaires.

A) Quantification de la fluorescence in vivo provenant de la sonde Ostéosense après 17 semaines de traitement avec du Tamiflu® (50mg/kg) Après détermination d'une zone d'intérêt, le signal fluorescent a été analysé dans chaque groupe. B) Images représentatives de la fluorescence ex vivo provenant de la sonde Ostéosense après extraction de l'arbre vasculaire Après récupération du signal, les images ont été obtenues. L'importance du signal est indiquée par une variation de couleur, la fluorescence étant d'autant plus élevée que la couleur rouge apparaît. C) Quantification des images obtenues en B). La détermination d'une zone d'intérêt superposable à l'ensemble des sujets permet de quantifier le signal dans un même volume et donc de comparer les différentes conditions expérimentales. $n = 9$. $p < 0,01$ ***

Le dosage sérique de la CathS a également montré une incapacité du Tamiflu® à inhiber ce processus. L'analyse des données semblent montrer une légère mais non significative diminution de 10% chez les souris urémiques traitées avec le Tamiflu® comparée aux souris urémiques ayant reçu du sérum physiologique, la quantité de CathS exprimée dans les souris Sham étant beaucoup plus faible (-65% comparativement à SP IRC) (Figure 57).

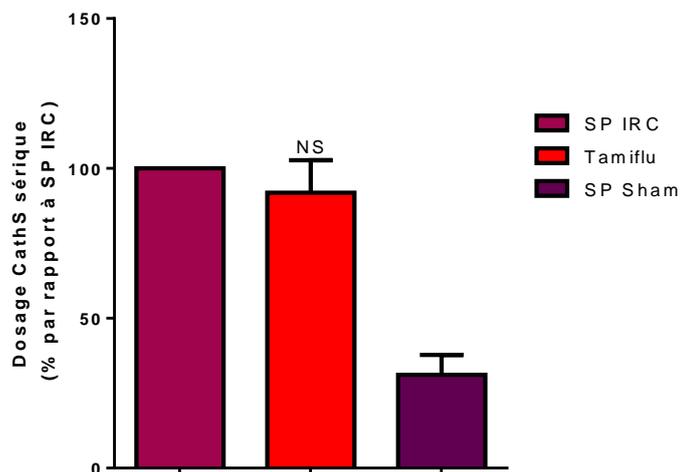


Figure 57 : Influence du Tamiflu® sur l'expression de la CathS au cours de l'IRC. Après 17 semaines d'urémie, le sérum de souris *ApoE^{-/-}* IRC traitées avec du Tamiflu® (50mg/kg), une solution contrôle de sérum physiologique, ou de souris SP Sham a été récupéré. La CathS circulante a été dosée à l'aide d'un kit ELISA spécialement dédié. *n* = 9

Nous avons terminé notre étude de l'influence du Tamiflu® en évaluant son impact sur la rigidité artérielle et sur le rythme cardiaque, deux processus altérés en conditions d'IRC (160,391).

Pour cela, l'évolution de la rigidité artérielle a été suivie grâce à l'utilisation d'un "mouse doppler" qui permet de calculer la vitesse d'onde de pouls (VoP) de façon non-invasive. Il est constitué de sonde de fréquences différentes dont l'une est placée dans la partie basse de l'aorte abdominale et l'autre capte le signal au niveau de la crosse aortique. La fixation des deux sondes permet de déterminer la distance entre elles et donc d'en déduire la vitesse de déplacement de l'onde. Les résultats semblent montrer une augmentation fulgurante de la VoP après 8 semaines de traitement pour les souris urémiques. En effet, leur VoP est multipliée par deux au cours de cette période contrairement au souris Sham dont la VoP est plus faible mais également plus stable tout au long de l'étude. De la même manière, le traitement avec le Tamiflu® semblent stabiliser la VoP des souris urémiques au même niveau que les souris Sham (Figure 58).

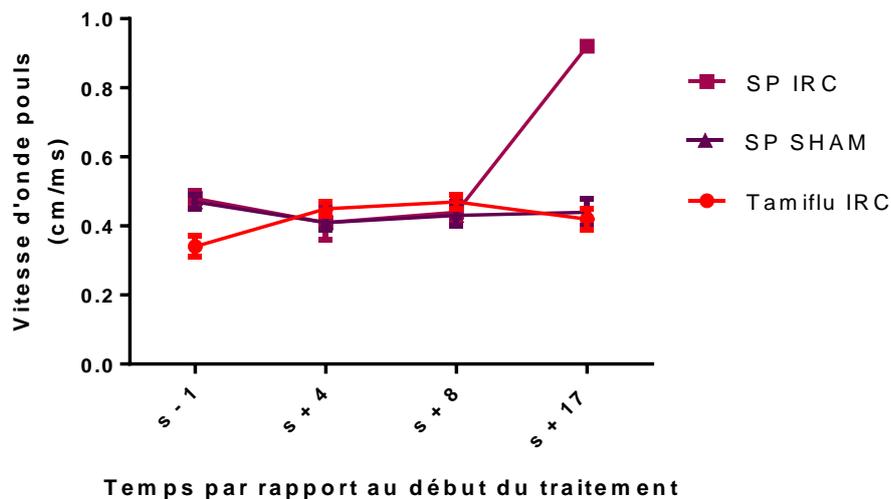


Figure 58 : Influence du Tamiflu® sur l'évolution de la rigidité artérielle. La vitesse de déplacement de l'onde de pouls, reflet de la rigidité artérielle, a été évaluée mensuellement pendant 17 semaines à l'aide d'un " mouse doppler ", en présence ou non de Tamiflu® à 50mg/kg (n = 9).

L'inhibition de Neu-1 pourrait à long terme protéger les souris urémiques de la rigidité aortique apparaissant progressivement au cours du temps. Ainsi, malgré un impact nul voire amplificateur sur les calcifications vasculaires, le Tamiflu® pourrait se révéler efficace sur un autre mécanisme intervenant dans le développement de cette complication vasculaire.

En parallèle, une mesure mensuelle du rythme cardiaque a été réalisée grâce à l'utilisation d'un " mouse doppler ". Cette modalité est associée à une plaque thermorégulatrice possédant des détecteurs au niveau des pattes de l'animal permettant la détection de la fréquence cardiaque. L'analyse du rythme cardiaque semble montrer une diminution progressive chez les souris contrôles IRC (SP IRC) contrairement aux souris Sham. De manière intéressante, le Tamiflu® semble avoir un effet bénéfique sur le rythme cardiaque des animaux IRC avec une tendance à rejoindre le contrôle Sham (Figure 59). Ces résultats préliminaires pourraient suggérer que l'inhibition de Neu-1 pourrait un rôle stabilisateur du rythme cardiaque.

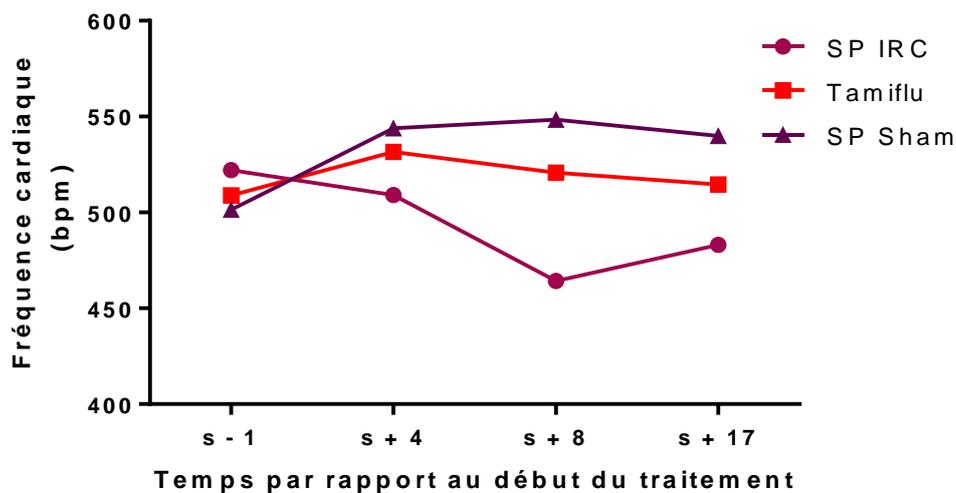


Figure 59 : Influence du Tamiflu® sur l'évolution de la fréquence cardiaque. *Le rythme cardiaque a été évalué mensuellement pendant 17 semaines à l'aide d'un " mouse doppler ", possédant la capacité de comptabiliser les battements/min chez la souris, en présence ou non de Tamiflu® à 50mg/kg (n = 5).*

Par conséquent, les résultats obtenus dans cette partie montrent que les premières tentatives d'inhibition de la participation des EDPs aux complications vasculaires associées à l'IRC *via* l'inhibition du CRE, et particulièrement de la sous-unité Neu-1 à l'aide de Tamiflu®, se sont révélées dans l'ensemble infructueuses, bien que l'amélioration de certains paramètres ait été observé. Cependant, de primes abords étonnants, ces résultats pourraient s'expliquer comme nous en discuterons ultérieurement dans ce manuscrit.

*Discussion_
Conclusions_
Perspective*

V. Discussion _ Conclusions _ Perspectives

L'IRC, caractérisée par une diminution de la fonction rénale, touche entre 10 et 15 % de population mondiale (4). Elle est associée au développement de nombreuses complications cardiovasculaires telles que l'athérosclérose (133) et les calcifications (11). Ces atteintes vasculaires sont responsables d'environ 50% des décès chez les patients atteints d'IRC (392) avec une prévalence plus importante pour les calcifications médiales (11). Au cours de l'IRC, il a été mis en évidence que les calcifications, retrouvées principalement dans la média de la paroi vasculaire (393), ne sont pas simplement dues à un dépôt passif d'hydroxyapatite. En effet, de nombreuses données de la littérature montrent que sous l'influence d'une hyperphosphatémie, observée au cours de l'IRC, une ostéodifférenciation des CMLs est responsable de cette complication vasculaire (369). Cette différenciation entraîne l'acquisition d'un phénotype ostéoblastique par les CMLs qui sont alors capables d'induire le développement des calcifications de la MEC environnante notamment des fibres élastiques. Au cours de cette pathologie, il a été constaté une dégradation progressive de ces fibres élastiques associée à une libération d'EDPs (174) qui pourraient jouer un rôle central dans les mécanismes liés aux calcifications vasculaires. D'une part, il a été observé que ce processus se retrouve majoritairement au sein des zones de fractures des fibres élastiques (173). D'autre part, des études *in vitro* semblent mettre en évidence que les EDPs potentiellement libérés lors de l'élastolyse pourraient être impliqués dans les mécanismes liés aux calcifications vasculaires (228). Ces résultats supposent donc une activation accrue d'élastases comme la CathS dont l'expression est augmentée au cours de l'IRC (349). De plus, de nombreux modèles *in vivo* suggèrent une corrélation positive entre son expression, l'élastolyse et les calcifications vasculaires. Cependant, le lien direct entre CathS, élastolyse, production d'EDPs bioactifs et calcification n'avait jamais été montré. Par ailleurs, le (les) inducteur(s) moléculaire(s) impliqué(s) dans l'expression ou l'activité protéolytique de la CathS, au cours de l'IRC, restai(en)t encore inconnu. Néanmoins, de manière tout à fait intéressante, le récepteur RAGE, semblant impliqué dans des processus semblables à ceux imputables à la CathS au cours de l'IRC (284,394), pouvait constituer un candidat de choix .

Ce travail de thèse a permis, pour la 1^{ère} fois, de mettre en évidence l'implication majeure de l'axe RAGE/CathS/EDPs dans le développement des calcifications vasculaires au

cours de l'IRC. Au travers de différents modèles - *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* - nous avons montré que, dans ce contexte physiopathologique, RAGE est un relais moléculaire important impliqué dans l'expression de la CathS, elle-même responsable de la libération d'EDPs bioactifs. Ces peptides possèdent un effet potentialisateur des processus d'ostéodifférenciation impliqués dans les calcifications vasculaires. L'utilisation de divers inhibiteurs ciblant à la fois la sous-unité Neu-1 et la sous-unité EBP du CRE associée à des expériences de simulations moléculaires ont permis de mettre en exergue l'implication du CRE dans cet effet médié par les EDPs spécifiquement libérés suite à l'action de la CathS. Enfin, de manière intéressante, ces EDPs sont également impliqués dans une boucle d'amplification de ces processus grâce leur capacité à induire l'expression de la Cath S au cours de l'IRC.

Dans un premier temps, nous avons validé notre modèle *in vivo* de vasculopathie urémique présentant ou non une délétion pour le récepteur RAGE. Pour cela, différentes variables biochimiques altérées au cours de l'IRC ont été dosées (urée, calcium, phosphate, cholestérol et triglycérides). Les résultats ont montré que 17 semaines après l'acte chirurgical, une augmentation significative de ces variables a été observée dans les animaux ayant subi la néphrectomie comparativement aux animaux contrôles Sham (contrôle de chirurgie) possédant une fonction rénale normale. L'urémie associée à l'IRC est particulièrement visible, tout comme une augmentation de la phosphatémie, confirmant la mise en place de notre modèle d'IRC. L'augmentation de l'expression de RAGE dans l'aorte des souris IRC comparée aux souris Sham a également été observée. Ceci reproduit les données décrites au cours des études cliniques montrant que l'IRC induit une élévation de l'expression de ce récepteur (292). De plus, notre équipe a également montré que ce modèle d'IRC induit une accélération du développement des plaques d'athérosclérose (271) comme démontré par Massy et *al* (172). Enfin, la délétion de RAGE induit une diminution significative de son expression transcriptomique dans les modèle IRC et Sham ce qui approuve notre modèle DKO. Nous avons donc à notre disposition un modèle *in vivo* reproduisant les mécanismes propres à l'IRC chez lequel la délétion de RAGE est bien effective. Ce modèle a alors été utilisé, dans un premier temps, pour étudier l'impact de RAGE dans les processus de calcifications vasculaires et d'élastolyse.

Au cours de l'IRC, il a été observé un important remodelage vasculaire caractérisé par le développement de calcifications vasculaires et par une dégradation progressive des fibres

élastiques (173). Cependant l'(les)acteur(s) moléculaire(s) responsable(s) de ces mécanismes reste(nt) encore à définir. Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que des ligands de RAGE tels que les AGEs ou des protéines de la famille des S100 comme le S100A12 sont impliqués dans les mécanismes d'ostéodifférenciation mais aussi dans l'élastolyse observée au cours de l'IRC (284,395). Ces données suggèrent alors que RAGE, activé par ses ligands, pourrait être le récepteur responsable de ces effets. Nos résultats montrent, après 17 semaines post chirurgie, que la délétion de RAGE induit une diminution significative des calcifications vasculaires observées *in vivo* grâce à l'utilisation d'une modalité d'imagerie pré-clinique, le FMT. De plus, grâce aux propriétés d'autofluorescence de l'élastine, nous avons démontré que cette délétion entraîne une diminution importante du nombre de fractures par fibre traduisant une dégradation moindre des fibres élastiques. Ces résultats démontrent alors que RAGE est le récepteur impliqué dans le remodelage vasculaire au cours de l'IRC. Son engagement dans l'élastolyse soulève alors l'hypothèse d'un lien avec une élastase. Or au cours de l'IRC, une élastase, la CathS, est très fortement exprimée. Diverses études ont mis en évidence une corrélation entre l'expression de la CathS, les phénomènes de calcifications vasculaires et l'élastolyse observés au cours de l'IRC (30,175). Les processus régulés par RAGE au cours de l'IRC étant semblables à ceux dans lesquels la CathS semblait impliqué, nous avons évalué le rôle que RAGE pouvait jouer dans son expression.

Nous avons utilisé notre modèle d'IRC présentant ou non une délétion pour le récepteur RAGE afin d'évaluer *in vivo* l'activité des cathepsines, en particulier, la CathS. Les résultats ont montré qu'au cours de l'IRC, une augmentation importante de l'activité enzymatique est observée chez les souris ApoE^{-/-} comparées au souris DKO. Ces données ont été corrélées avec des immunomarquages montrant une élévation d'expression de la CathS dans les crosses aortiques des souris ApoE^{-/-}IRC comparée au DKO IRC. Enfin, un dosage sérique de cette protéase a montré une augmentation de son taux circulant dans les souris ApoE^{-/-}IRC comparé aux DKO IRC. Ceci suggère ainsi que l'augmentation de l'activité protéasique *in vivo* et l'élastolyse subséquente induit par RAGE seraient en grande partie imputable à l'augmentation d'expression de la CathS. Cependant, des données de la bibliographie ont mis en évidence que le taux sérique d'une autre cathepsine, la CathL est également augmenté au cours de l'IRC mais de façon moins importante que la CathS (396). De plus, la CathS est la seule, à l'heure actuelle, dont l'expression a été corrélée à une diminution du taux de filtration glomérulaire (349) en comparant une population saine avec une cohorte de patients urémiques mais aussi dans un

modèle murin d'IRC. Enfin, les modèles *in vivo* d'IRC préalablement étudiés montrent que seule l'expression de la CathS est corrélée positivement à l'apparition de calcifications médiales et à la dégradation des fibres élastiques (30,175). Fort de ces observations, il semble tout à fait probable que la CathS soit la cystéine protéase majeure dans notre modèle d'IRC. Afin de définitivement conclure sur le lien direct entre RAGE et la CathS, nous avons démontré qu'en utilisant un ligand de RAGE, le S100A12, la CathS est surexprimée par les CMLs. Par conséquent, RAGE est un réel inducteur de l'expression de la CathS au cours de l'IRC. Néanmoins, le temps de stimulation de 48h nécessaire pour observer l'effet du S100A12 suggère un relais moléculaire qui reste encore à découvrir. Des données de la bibliographie pourraient avoir mis en évidence une cytokine pouvant faire le lien entre RAGE et la CathS. En effet, l'activation de RAGE induit la forte expression d'une cytokine pro-inflammatoire, IL-1 β (285), qui a été identifiée comme induisant l'expression de la CathS par les CMLs (121). L'utilisation d'un anticorps bloquant anti-IL-1 β suite à une stimulation des CMLs par S100A12 confirmerait cette hypothèse.

D'après nos données et celles d'autres groupes, la CathS semble donc jouer un rôle central dans la dégradation des fibres élastique dans un contexte d'IRC. Néanmoins, il n'existe, à ce jour, aucunes données bibliographiques démontrant directement que la CathS est capable de dégrader de l'élastine en produisant des peptides bioactifs, et possiblement pro-calcifiants. Nous nous sommes alors focalisés sur l'étude de l'activité élastolytique de la CathS ainsi que sur l'analyse biochimique des peptides obtenus en utilisant une combinaison de microscopie électronique à balayage et de spectrométrie de masse.

Pour cela, nous avons digéré de l'élastine insoluble obtenue avec la méthode de Lansing, la méthode de Schmelzer ainsi que de la tropoélastine. Ces méthodes permettent d'obtenir des fibres d'élastine, d'ultrastructure semblable à celle des fibres élastiques mais dénuées de microfibrilles. La tropoélastine n'étant plus visible après la digestion, seule l'élastine insoluble a été analysée en microscopie électronique à balayage. Les résultats ont montré d'une part que la CathS est capable d'entraîner une modification profonde la structure des fibres d'élastine après 8h ou 24h de digestion. D'autre part, nos images de MEB semblent supposer une dégradation plus intense quand le substrat a été obtenu avec la méthode de Lansing comparée à l'élastine extraite par la technique de Schmelzer (ce qui a été confirmé par les analyses en spectrométrie de masse comme nous en discuterons ci-dessous). Ceci peut s'expliquer en partie par les caractéristiques des méthodes de purification. En effet, ces deux techniques se

différencient par leur intensité de dégradation au cours de l'extraction de l'élastine insoluble. En effet, la méthode Lansing utilise des procédés expérimentaux agressifs combinant à la fois des températures élevées avec une forte concentration de soude (371), comparée à la technique d'extraction de Schmelzer, une optimisation de la technique de Daamen, elle-même issue de la méthode de Starcher ayant recours seulement à des solvants et à l'utilisation de CNBr et de trypsine (360,372). Dans les deux cas, les méthodes utilisées permettent d'obtenir de l'élastine insoluble avec un degré de pureté élevé mais il a été décrit que la dégradation de l'élastine insoluble lors de sa purification est plus élevée suite à l'extraction utilisant la méthode Lansing comparée celle de Starcher (372). Bien que l'élastine d'aorte ait été préalablement décrit comme étant un substrat plus facilement dégradable par la CathS, la plus grande dégradation de l'élastine de ligament dans nos expériences comparativement à celle d'aorte est très certainement due à la méthode de purification, un substrat endommagé pouvant montrer une plus grande accessibilité à l'enzyme. Afin de confirmer ces observations et de montrer la production potentielle d'EDPs théoriquement bioactifs, nous avons analysé, par spectrométrie de masse, les peptides produits après élastolyse des différents substrats. Nous avons montré que la digestion de la tropoélastine s'accompagne d'une production très importante de peptides suivie en nombre par la dégradation de l'élastine insoluble extraite selon Lansing et enfin celle produite par la technique de Schmelzer affichant le nombre de peptides le plus faible (respectivement 396, 262 peptides et 68 peptides). Ceci confirme ainsi les données visuelles obtenues par la microscopie électronique à balayage. L'analyse des sites de clivage retrouvés au sein des différents substrats à la suite de l'action de la CathS a montré que les principaux acides aminés observés aux positions P1-P4 et P'1-P'4 sont la glycine, l'alanine, la valine et la proline avec une occurrence plus élevée pour la glycine. L'étude approfondie des positions les plus proches du site catalytique P1 et P'1, a confirmé que la glycine est l'acide aminé prépondérant dans les deux types d'élastine insoluble. Il a été démontré que la glycine, la valine et l'alanine sont également les acides aminés majeurs au sein de ces positions (P1-P4, P'1-P'4) lors de la digestion d'élastine insoluble par d'autres élastases telle que la neutrophile élastase (194). Tout comme ces élastases, la CathS semble pouvoir s'accommoder d'acides aminés de petite ou de moyenne taille, aliphatiques, hydrophobes qui représentent environ 55% des acides aminés de la séquence de l'élastine (397). Nos études confirment de plus des données de la littérature qui ont montré que la poche S1 de la CathS montre une plus grande préférence vis-à-vis de petits résidus hydrophobes en position P1 tels que l'alanine (322) ou la glycine (398). L'étude structurale de la CathS a également permis d'identifier une autre poche importante dans

son interaction avec le substrat, la poche P2-S2, impliquée dans la détermination de la spécificité. Il a été mis en évidence qu'à la position P2, la CathS se lie préférentiellement à des acides aminés aliphatiques tels que la valine (398) et que nous avons largement retrouvé aux positions P1-P4 pour les deux types d'élastine insoluble testées. Ainsi, nos résultats confirment clairement que l'élastine semble être un substrat privilégié pour la CathS, car possédant tous les déterminants moléculaires nécessaires à une catalyse efficace. Il est intéressant de rappeler que CathS semble agir de manière plus efficace sur de l'élastine partiellement dégradée. De manière intéressante, une étude longitudinale a montré qu'au cours de l'urémie, la MMP-9 est la première élastase qui voit son expression augmentée suivie de la MMP-2 et enfin de la CathS (173). Les MMP-2 et MMP-9 sont considérées comme de faibles élastases comparativement à l'élastase leucocytaire (183). Ceci peut expliquer en partie le fait que les KO de ces animaux ne bloquent pas totalement l'élastolyse observée lors de processus d'athérosclérose et de calcifications contrairement aux KO de CathS (30,173,399). Ceci soulève ainsi une hypothèse. En effet, au cours de l'IRC, les fibres élastiques pourraient tout d'abord être partiellement dégradées par la MMP-2 et la MMP-9. Au sein de ce réseau de protéases, la CathS pourrait se positionner comme l'élastase responsable de la dégradation importante des fibres élastiques, corroborant les résultats des modèles KO. Il pourrait ainsi être intéressant de tester cette hypothèse en utilisant les méthodes combinées de microscopie électronique à balayage et de spectrométrie de masse telles qu'utilisées lors de ce travail de thèse.

Tel que décrit dans la partie résultats, l'élastine insoluble produite par la méthode de Schmelzer est considérée comme étant la plus proche structurellement de celle trouvée physiologiquement. Nous avons ainsi sélectionnés des peptides à partir de ceux produits *via* cette méthode, dans le but d'évaluer leur potentiel effet pro-calcifiant, en postulant du fait qu'ils seraient certainement plus proches de ceux produits en conditions physiopathologiques d'IRC *in vivo*. De plus, lors de notre processus de sélection nous y avons ajouté d'autres contraintes. Les peptides choisis devaient bien sûr posséder le motif GxxPG, être spécifiquement produits par la CathS (dans la limite des données disponibles), mais également pouvoir être produits à partir de tropoélastine, substrat physiologiquement pertinent. Ceci nous a alors permis de sélectionner les quatre peptides suivants :

- VPGAVPGGVPGGVF (P1)
- GAVPGGVPGGVF (P2)
- GLGPGGFPGIG (P3)
- VKPGKVPGVG (P4)

P1 et P2 présentent une séquence semblable mais P1 est un peu plus long et possède les résidus VP en N-terminal. Ceci nous a de plus permis d'analyser l'influence de la longueur du peptide sur la bioactivité et particulièrement le rôle potentiel de la proline supplémentaire. P3 possède deux motifs GxxPG enchainés et présente la singularité de posséder une isoleucine, très peu retrouvée dans la séquence de la tropoélastine. P4 à la particularité rare de posséder une lysine dans le motif GxxPG dont le rôle dans ce motif et sa bioactivité n'ont jamais été étudiés. En effet, ce résidu est normalement principalement impliqué dans la formation de liaison croisées entre tropoélastines et l'existence de résidus lysyls natifs dans l'élastine cross-linkée est rare. Sa présence au sein d'un peptide GxxPG est ainsi d'autant plus intéressant à étudier.

L'alignement de séquence de ces EDPs avec la séquence de la tropoélastine montre que P1 et P2 se trouvent dans les séquences codées par l'exon 2, P3 par l'exon 20 et P4 par les exons 8 et 9. L'examen approfondi de la structure de la tropoélastine a montré que l'ensemble de ces exons sont retrouvés dans des zones désordonnée et donc favorables à la flexibilité ce qui augmentent la probabilité de ces régions à être exposées et donc accessibles (400). Il a été de plus démontré que la séquence codée par l'exon 2 est également la cible d'autres élastases telles que la MMP-7, la MMP-9 et la MMP-12 (183), bien que le peptide sélectionné ne soit pas libéré par ces protéases. L'ensemble de ces observations tendent ainsi à démontrer que les zones de la tropoélastine contenant ces EDPs présentant un fort potentiel d'interaction avec des protéases, particulièrement avec la CathS comme nos résultats l'ont montré. Ceci renforce ainsi la pertinence du choix de ces quatre peptides qui pourraient clairement être libérés lors de l'élastolyse associée à l'IRC.

La CathS étant capable de libérer des peptides d'élastine potentiellement bioactifs, et l'expression de cette protéase étant clairement corrélée au développement des calcifications vasculaires (30,175), nous avons testé leur potentielle influence pro-calcifiante. L'étude des processus de calcification vasculaire a permis de mettre en évidence le mécanisme sous-jacent,

une ostéodifférenciation des CMLs impliquant une forte concentration de Pi, observée au cours de l'IRC (163,401). Lors de ce processus, les CMLs expriment alors des protéines ostéoblastiques telles que RunX2 ou ostéopontine, et répriment l'expression des molécules spécifiques des cellules musculaires lisses telle que SM22 α (402) (375). L'utilisation d'un modèle *in vitro* de calcifications nous a permis de montrer que les EDPs provenant de l'activité de la CathS sont capables d'accélérer les processus de calcifications en condition hyperphosphatémique. Les quatre peptides testés présentent des effets similaires bien que P4 ait démontré une difficulté de reproductibilité de ces effets, tel que décrit dans la section "Résultats" du présent manuscrit. L'étude des marqueurs de différenciation ostéogéniques précités ont montré que ces EDPs combinés au Pi entraînent une augmentation significative par rapport au Pi seul de l'expression de RunX2, facteur de transcription fondamental dans les processus de calcification (403), mais aussi de ostéopontine, un marqueur tardif de différenciation (233,380). De plus, les EDPs testés entraînent une diminution drastique de l'expression de SM22 α , amplifiant les effets du Pi. Ainsi, nos résultats indiquent explicitement que les EDPs accélèrent l'ostéodifférenciation des CMLs dans un contexte hyperphosphatémique retrouvé au cours de l'IRC.

Les quatre EDPs sélectionnés présentent le motif GxxPG suggérant l'implication du CRE. Afin d'évaluer cela, le DANA (inhibiteur de sialidase) et le CS (antagoniste de l'EBP), permettant d'inhiber les effets biologiques des EDPs impliquant le CRE (216,368), ont été utilisés. L'utilisation de ces deux inhibiteurs a permis de bloquer les effets pro-calcifiants *in vitro* des EDPs testés bien que l'influence de P4 n'ait pas été systématiquement inhibée.

En effet, P4 a présenté sur l'ensemble de nos manipulations, un caractère particulier, et ce de deux façons différentes. Tel que cité ci-dessus, P4 n'a dans certains cas pas été en mesure d'augmenter le processus de calcification alors même que P1, P2 et P3 présentaient toujours cet effet. Lorsque c'était le cas, tel que décrit ci-dessus, il est arrivé que DANA et CS se soient montrés incapables d'inhiber son effet sur l'ostéodifférenciation des CMLs, alors que cela était le cas pour les autres peptides. Ces dernières données suggéraient l'existence de deux processus, un CRE-dépendant et un autre, CRE-indépendant.

Afin d'expliquer cela, mais aussi afin de confirmer l'interaction potentielle entre les EDPs sélectionnés et l'EBP, des études de relations structures/fonctions ont été réalisées.

Les comportements moléculaires des EDPs vis-à-vis de l'EBP ont ainsi été étudiés par une approche bio-informatique permettant d'analyser les énergies de liaisons traduisant les

probabilités d'interaction. Des expériences préliminaires de docking moléculaire montrent que P1, P2 et P3 présentent de nombreuses positions avec des énergies de liaisons faibles toutes aussi favorables à une interaction avec l'EBP que le peptide VGVAPG validé au sein de notre laboratoire (358). Ceci corrobore alors nos résultats *in vitro* encourageant l'implication de EBP dans l'effet potentialisateur des EDPs, et notamment de P1, P2 et P3. De façon surprenante, P4 affiche peu de positions avec des énergies de liaison favorables à une interaction avec l'EBP. Cependant, la seule position qui ressort de cette étude comme pouvant structurellement interagir avec l'EBP est associée à une énergie de liaison plus élevée que le VGVAPG. Ainsi, ces données expérimentales montrent que P4 semble avoir une faible probabilité d'interaction avec l'EBP, mais sous l'influence de son environnement, il pourrait adopter une structure fortement favorable à une interaction. Ces données pourraient en partie expliquer les réponses variables du P4.

Afin d'expliquer la possible existence d'un mécanisme de calcification indépendant du CRE, particulièrement pour le P4, nous nous sommes posés la question de savoir si les EDPs que nous avons sélectionnés pourrait constituer des sites de nucléations pour les cristaux d'hydroxyapatite, la forme la plus stable de phosphate de calcium (404). En effet, dans la littérature, il a été démontré que la dégradation de l'élastine induit un changement de polarité de cette protéine augmentant son affinité pour le calcium. Des études structurales ont permis de mettre évidence que cette interaction est possible grâce à la présence de sites de liaison neutres au niveau des glycines impliquant la présence locale de charges positives dans la structure de l'élastine. La juxtaposition de ces sites forme des site de nucléation favorisant le développement de calcifications le long des fibres élastiques (405,406). Par conséquent, la dégradation de l'élastine pourrait alors exposer des zones de liaison au calcium qui serviraient alors de sites de nucléation. Il nous a semblé probables que P4 puisse se comporter de la sorte puisque sa séquence présente à la fois des résidus glycylys et lysylys, ce dernier étant un acide aminé présentant une forte affinité avec de l'hydroxyapatite (404). Afin de valider cette hypothèse, nous avons réalisé une étude préliminaire faisant appel à des outils bio-informatiques pour caractériser l'interaction entre P4 et l'hydroxyapatite, mais aussi tester cette hypothèse pour nos autres peptides Nos résultats montrent que P4 présente une faible énergie d'interaction, laissant à penser que ce peptide est visiblement capable d'interagir avec ce cristal et pourrait donc de jouer le rôle de site nucléation. Cette hypothèse reste encore à valider par une étude plus précise de cette interaction *via* des expériences de mutagenèse dirigée permettant de remplacer au sein du P4 les résidus lysylys par d'autres acides aminés. Cela pourrait avoir comme conséquence la

modification de son comportement vis-à-vis des processus de calcification observé dans notre modèle *in vitro*. De manière inattendue, P1 semble également présenter de l'affinité avec le calcium bien que nous ne l'ayons pas observé, certainement dû à sa propension à interagir fortement avec EBP qui pourrait être sa cible prioritaire.

De manière surprenante, nos résultats ont également démontré que les calcifications induites par le Pi étaient inhibées par le DANA et le CS. Ceci pourrait suggérer l'existence d'un complexe membranaire impliquant le CRE mais aussi l'une des cibles du Pi, le transporteur majeur du phosphate, Pit-1 (407). Cette protéine est surexprimée dans les zones calcifiées de l'aorte (167), est reconnue comme étant un acteur clef dans le développement des calcifications vasculaires en participant à l'ostéodifférenciation des CMLs (408). Neu-1 est capable de moduler l'activité de diverses protéines membranaires. Hinek *et al* ont par exemple montré que cette sialidase est capable de moduler l'activité de l'IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*) en hydrolysant les acides sialiques portés par ses chaînes de glycosylation (409). Notre équipe a également démontré que cette sous-unité est impliquée dans la désialylation du récepteur de l'insuline mais également du CD36, jouant un rôle dans l'apparition de l'insulinorésistance et dans le développement de l'athérosclérose (191,215,216).

Ainsi, il pourrait être envisagé que des processus de sialylation/désialylation puissent être impliqués dans la régulation de Pit-1, ce dernier étant glycosylé (410). Le CRE, *via* Neu-1, pourrait participer à ces processus ce qui expliquerait les effets observés en présence de CS et de DANA. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer cette hypothèse. Dans ce but, l'approche méthodologique la plus judicieuse serait d'utiliser une combinaison de méthodes d'immunoprécipitation et de "lectin assay" en utilisant des lectines spécifiques de l'acide sialique et des différents branchements (215,216,411,412). En parallèle, il serait également important d'identifier la voie de signalisation qui pourrait être également engagée après la fixation des EDPs sur le CRE en ayant recours à des expériences de western blot. En nous appuyant sur des résultats de la littérature, il semble que la voie des MAPK "*Mitogen Activated Protein Kinase*" est celle qui soit la plus pertinente. En effet, notre équipe a démontré que la fixation des EDPs sur le CRE entraîne l'activation de nombreuses voies de signalisation responsables de leurs multiples effets biologiques dont celle des MAPK (388). De plus, il a été démontré que cette voie phosphoryle, et donc active RunX2, ce qui induit l'expression des gènes en aval (413). La fixation des EDPs sur l'EBP pourrait induire cette voie de signalisation activant RunX2. De plus, l'activation de ce facteur de transcription est par ailleurs potentialisée

par l'entrée importante du Pi dans les CMLs *via* une augmentation d'expression de Pit-1 (168). Des manipulations sont en cours et pourraient en partie expliquer l'effet potentialisateur des EDPs sur la calcification induite par le PI.

Nous avons poursuivi la validation des effets pro-calcifiants des EDPs dérivés de l'action de la CathS avec un modèle plus complexe d'anneaux aortiques reflétant davantage la réalité physiologique. Le traitement des anneaux aortiques avec les EDPs en présence de Pi induit de fortes calcifications démontrées par un intense marquage Von Kossa comparée au Pi seul. Ces résultats confirment les données que nous avons obtenues *in vitro* renforçant l'influence pro-calcifiante des EDPs. Il serait intéressant d'également valider la participation de l'ERC dans ce processus de calcification *ex vivo* à l'aide des inhibiteurs et antagonistes de l'ERC précités. Il pourrait de plus être intéressant d'ajouter de la CathS recombinante à ce modèle d'anneaux aortiques afin d'évaluer son activité élastolytique dans des conditions proches de celles observées physiologiquement. L'autofluorescence de l'élastine nous permettra de dénombrer les fractures au sein des fibres élastiques. En parallèle, l'identification par spectrométrie de masse des peptides d'élastine retrouvés dans le milieu de culture à la suite de l'élastolyse induite par la CathS recombinante permettrait de définitivement confirmer la pertinence physiologique des EDPs que nous avons sélectionnés. De plus, l'analyse des calcifications par marquage Von Kossa dans ce contexte permettrait de boucler *ex vivo* le lien CathS/calcifications. Enfin, il serait intéressant de stimuler des anneaux aortiques avec du S100A12 puis de détecter la présence de CathS (immunohistochimie ou ELISA), les EDPs subséquentement produits (spectrométrie de masse) et les calcifications afin de définitivement valider l'axe RAGE/CathS/EDPs/calcifications dans un modèle plus proche de la physiologie. Nous avons réalisé des premières manipulations en ce sens qui sont en cours d'analyse.

Afin de définitivement valider le rôle pro-calcifiant des EDPs dérivés de l'action de la CathS, il était nécessaire de réaliser une validation *in vivo*. Dans le but de limiter le nombre d'animaux utilisés, et sachant que les différents peptides dérivés de l'activité élastolytique de la CathS se sont montrés prompts à amplifier fortement les calcifications, notre choix s'est orienté vers P1 qui a de plus montré la meilleure reproductibilité lors de nos études *in vitro* et *ex vivo* et pour qui les données *in silico* ont révélé une forte probabilité d'interaction avec le CRE, mais également avec le calcium. Ainsi, il apparaît que P1 soit le meilleur candidat pour la mise en place d'une étude permettant de valider définitivement l'effet accélérateur des EDPs dans les

processus de calcifications vasculaires au cours de l'IRC, grâce à l'utilisation de notre modèle murin ApoE^{-/-}. La détection des calcifications vasculaires a été possible grâce à l'utilisation du FMT, modalité d'imagerie pré-clinique non invasive utilisant une sonde fluorescente qui se lie spécifiquement au bisphosphonate. La quantification de la fluorescence a montré que les injections répétées de P1 semblent entraîner une augmentation des calcifications vasculaires dans un contexte d'IRC comparée aux souris ayant reçu des injections de solvant uniquement. En parallèle, nous avons également quantifié cette sonde *ex vivo* après dissection de l'arbre vasculaire (cœur, cross aortique et aorte) afin de palier l'atténuation de la fluorescence par la présence de tâches mais aussi de poils dans la zone de détection. En effet, nous avons utilisé des souris C57BL/6 ApoE^{-/-} pour cette étude dont certaines présentaient des tâches noires et des poils sur la partie dorsale qui, même après épilation, n'ont pas pu être éliminées. Or, le FMT utilisant la technique de trans-illumination, la zone d'intérêt doit être propre dans son intégralité pour récupérer l'ensemble du signal. Les observations de cette quantification *ex vivo* montrent que la majorité de la fluorescence spécifique des calcifications vasculaires est localisée dans le système vasculaire principal. De plus, l'analyse de la fluorescence confirme les données *in vivo* selon lesquelles P1 pourrait favoriser le développement des calcifications vasculaires. Cette étude bien que préliminaire semble confirmer l'effet potentialisateur, observé *in vitro* et *ex vivo*, des EDPs dérivés de l'action de la CathS dans un contexte d'IRC. Néanmoins, il nous paraît primordial de valider définitivement cet effet par une exploration *in vivo* plus complète.

Dans ce cadre, il serait également intéressant de prolonger le traitement jusqu'à 20 semaines, durée maximale avant sacrifice des souris retrouvée dans la littérature lors d'étude sur les calcifications vasculaires, sans avoir trop de mortalité (414). Ceci permettrait d'observer si l'EDP étudié a uniquement un effet accélérateur sur le développement des calcifications vasculaire ou si cet effet se maintient dans le temps. Le suivi longitudinal serait réalisé grâce à l'utilisation régulière du FMT et de l'Ostéosense.

De plus, lors de la progression des calcifications vasculaires au cours de l'IRC, il a été mis en évidence une augmentation de la rigidité artérielle. En effet, une étude clinique chez des patients hémodialysés a montré une corrélation positive entre le développement progressif de calcifications aortiques observées par rayons X et l'augmentation de la vitesse d'ondes de pouls reflétant une rigidité artérielle (415). Des modèles animaux d'IRC ont clairement démontré que les calcifications vasculaires retrouvées au cours de cette pathologie augmentent en même temps qu'une rigidité artérielle s'installe (416,417). Ainsi, afin d'approfondir notre étude, le

suivi de l'évolution de la rigidité artérielle en parallèle de celui des calcifications permettrait de corréler les modifications structurales de l'aorte avec leur impact fonctionnel lors du traitement avec P1. L'approche méthodologique répondant au mieux à cette problématique serait l'utilisation d'un "*mouse doppler*". Cette technologie permet de déterminer la vitesse de déplacement de l'onde de pouls grâce au positionnement de deux sondes sonores. L'augmentation progressive de la vitesse reflète une rigidification de l'aorte (362). Des manipulations ont été réalisées au laboratoire et sont en cours d'analyse.

Cette étude, pourrait de plus être complétée par une analyse en AFM (microscopie à force atomique) de la paroi aortique mais aussi de la rigidité des fibres élastiques résiduelles. En effet, le processus de rigidité vasculaire est à l'heure actuelle considéré du point de vue physiologique mais pas véritablement du point de vue mécanique au niveau moléculaire. Ce mécanisme est dû à la combinaison de différents facteurs (dégradation de l'élastine, augmentation de l'expression du collagène I, mise en place de cross-links au niveau des fibres de collagène, présence de calcifications) mais aucune étude n'a mesuré précisément les modifications de rigidité de la paroi vasculaire. De plus, il est également possible que les fibres élastiques résiduelles soient également plus rigides lors de l'IRC comparativement à une condition physiopathologique normale, participant au processus de rigidité artérielle *via* un processus à l'heure actuelle non considéré. Pour étudier ces paramètres, l'AFM apparaît comme étant particulièrement adaptée. Elle permet en effet, entre autres, de déterminer la rigidité locale des tissus mous comme l'aorte au cours de diverses pathologies telles que l'athérosclérose (418). Nous avons réalisé de premières études de mesure de la rigidité des fibres élastiques au cours du vieillissement dans un modèle murin comparé à un modèle pathologique d'IRC. Les résultats ont montré que les fibres élastiques des aortes provenant de souris d'IRC âgées de 20 semaines présentent un module d'Young et donc une rigidité moléculaire deux fois plus importante comparée à des fibres élastiques provenant de souris saines au même âge. Cette preuve de concept est ainsi prometteuse pour de futures études.

Enfin, la rigidité vasculaire est à l'origine de nombreuses complications cardiaques (hypertrophie ventriculaire, arythmie...) pouvant mener à des accidents graves (391). Il pourrait ainsi être intéressant de compléter notre étude de l'influence de P1 sur la rigidité vasculaire par des analyses en IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) permettant d'évaluer son impact sur le système cardiaque. Cette modalité d'imagerie préclinique non invasive permet d'obtenir une représentation anatomique précise du cœur mais également des données fonctionnelles diverses (419,420).

Nos résultats *in vivo* ont également montré que les animaux atteints d'IRC présentent un taux sérique de CathS plus important que les animaux contrôles. De manière très intéressante, ceux stimulés par P1 présentent un taux sérique encore plus élevé de CathS. Ceci suggérerait que les EDPs issus de l'action de la CathS pourraient être impliqués dans un cercle vicieux d'amplification de l'élastolyse et donc la production d'EDPs, tel que cela a été décrit pour d'autres protéases (206). Nous avons ainsi cherché à confirmer cela *in vitro* en stimulant des CMLs en culture avec P1 mais également avec du Pi. Le traitement des CMLs avec P1 pendant 48 h, entraîne une augmentation significative de l'expression de la CathS confirmant l'hypothèse que nous avons formulé. De manière surprenante, le même effet est observé avec du Pi et il serait intéressant de vérifier si un effet additif peut exister. Ainsi, en conditions d'hyperphosphatémie, la CathS peut voir son expression augmentée. Nos résultats font donc apparaître qu'au cours de l'IRC, l'accumulation de toxines urémiques telles que S100A12 augmente l'expression de CathS *via* RAGE, mais également que l'hyperphosphatémie associée à cette pathologie pourrait aussi constituer un inducteur important de cette élastase. L'élastolyse subséquente entraînerait la libération d'EDPs pro-calcifiants tels que P1, mais amplifierait également l'expression de CathS. Cette boucle d'auto-amplification favoriserait alors le développement des calcifications vasculaire au cours de l'IRC en participant au maintien à long terme des processus d'élastolyse.

L'ensemble des données accumulées au cours de ce travail de thèse a mis en lumière un axe RAGE/CathS/EDPs/calcifications au cours de l'IRC avec un accent important sur le rôle joué par les EDPs spécifiquement libérés par l'action de la CathS et le CRE. Ce dernier pourrait alors constituer alors une cible pharmacologique innovante pour lutter contre les calcifications médiales retrouvées au cours de cette pathologie et les complications associées (rigidité vasculaire, altération du rythme cardiaque...). Nous avons ainsi dans une dernière partie étudié l'influence lors de l'IRC de l'inhibition *in vivo* du CRE, et particulièrement de sa sous-unité transductrice Neu-1 sur différents paramètres.

Dans le cadre de cette étude préliminaire, notre stratégie s'est orientée vers l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de Neu-1, le Tamiflu[®], dont le principe actif est l'oseltamivir phosphate. Il a été démontré que cette molécule avait la capacité de bloquer de façon spécifique cette sialidase (421) et son utilisation *in vivo* comme agent anti-cancéreux dans le cadre du

cancer du pancréas a montré une grande efficacité (387). De plus, étant un médicament couramment utilisé dans le traitement contre la grippe, il possède une autorisation de mise sur le marché ce qui implique que les études de toxicologie, de tératogénèse, de pouvoir mutagène et de biodisponibilité ont déjà été menées. L'ensemble de ces éléments nous a donc paru pertinent pour réaliser des études de ciblage pharmacologique de Neu-1 avec cette molécule.

Nous avons utilisé notre modèle ApoE^{-/-} IRC, présentant comme nous l'avons décrit de larges plages d'élastolyse et donc une production d'EDPs associée, et avons tenté de bloquer leur participation aux calcifications vasculaires, évaluées par FMT après 17 semaines d'urémie. De manière surprenante, nos résultats préliminaires montrent que la Tamiflu® n'entraîne pas de diminution des calcifications, voire au contraire une potentialisation. L'analyse *ex vivo* de l'arbre vasculaire a confirmé cette tendance.

L'évaluation de l'influence de cet inhibiteur sur l'expression de le CathS semble démontrer que le Tamiflu® n'induit pas de variation notable comparée aux souris urémiques ayant reçu seulement du sérum physiologique. L'analyse des complications cardiovasculaires associées aux calcifications (rigidité artérielle, arythmie) à l'aide d'un "mouse doppler" nous a cependant permis de montrer un effet intéressant du Tamiflu®. Nos résultats montrent que l'IRC induit une augmentation importante de la rigidité artérielle comparativement aux souris Sham, données en lien avec la littérature (10). Dans notre modèle, cette pathologie semble également induire l'apparition d'arythmie, les souris IRC présentant une bradycardie comparées aux souris Sham, démontrant quant à elles une fréquence cardiaque plus élevée, données également en lien avec la littérature clinique (422). De manière très intéressante, l'utilisation de Tamiflu® semble diminuer la rigidité artérielle présente dans les animaux urémiques mais également une tendance au retour à la normale du rythme cardiaque.

Ces données préliminaires montrent donc que le Tamiflu® semble capable d'améliorer certains paramètres en lien avec les calcifications apparaissant au cours de l'IRC, mais est inefficace sur les calcifications et la production de CathS. Cependant, il est intéressant de remarquer que ces processus, non inhibés par l'oseltamivir phosphate, sont ceux pour lesquels nous, ainsi que d'autres équipes, ont montré une participation importante du Pi. Or, l'étude du métabolisme de l'oseltamivir phosphate montre qu'une fois ingéré, il est métabolisé en oseltamivir carboxylate par des estérases, composant actif de ce médicament (423). Les estérases en charge de cette métabolisation sont principalement hépatiques suggérant la libération de phosphate dans la circulation sanguine. En considérant l'existence d'une mole de phosphate par mole d'oseltamivir, ainsi qu'un volume sanguin moyen de 1,5 ml de sang pour

une souris de 20g, la dose de Tamiflu[®] utilisée ici (50 mg/kg soit 1 mg pour une souris de 20g), conduirait théoriquement à une augmentation de la concentration sanguine de Pi de 1,62 mM. Ceci pourrait ainsi amplifier le contexte hyperphosphatémique participant à une augmentation des calcifications vasculaires et de la CathS de manière indépendante du CRE, "cachant" les potentiels effets bénéfiques du Tamiflu sur les processus EDPs-dépendants. Bien sûr ce calcul théorique partirait du principe que 100% du Pi libéré par le Tamiflu[®] serait disponible, ce qui est impossible car seulement 75% de l'oseltamivir phosphate métabolisé atteint la circulation (423), et que seulement une partie de cela pénètre les vaisseaux. Néanmoins, afin de valider cette hypothèse, nous avons dosé le phosphate sérique pour chaque condition. Les résultats que nous avons obtenus semblent montrer une accumulation de 4% de phosphate pour les souris traitées avec le Tamiflu[®] comparée au souris urémiques, démontrant la véracité de notre hypothèse. Que cette faible augmentation de la concentration de Pi puisse potentialiser les calcifications et la production de CathS, et "cacher" les effets inhibiteurs de l'oseltamivir carboxylate reste cependant à démontrer. Pour cela, des expériences *in vitro* dans lesquelles nous mesurerions les calcifications induites par les EDPs dérivés de l'action de la CathS, tel que nous l'avons fait au cours de cette thèse, mais en présence de Tamiflu[®] et associée à la détermination de l'activité de Neu-1, nous renseignerait sur cette hypothèse. Nous avons réalisé des premiers tests et l'utilisation de Tamiflu[®] potentialise clairement les calcifications *in vitro*. Ces données restent à confirmer et des mesures d'activité sialidase sont en cours mais ces premiers résultats vont clairement dans le sens de l'idée que nous avons formulé. Ainsi, le Tamiflu[®] ne serait clairement pas un agent pharmacologique idéal pour lutter contre les calcifications et dans ce cadre, un anticorps bloquant anti-EDPs tel le BA4 ou le peptide V14 bloquant l'interaction entre EDPs bioactifs et l'EBP seraient certainement plus adaptés.

Les résultats que nous avons obtenus concernant la rigidité artérielle ainsi que les mesures de fréquence cardiaques suggèrent que le Tamiflu[®] aurait un impact positif sur ces deux paramètres. Ces derniers sont intimement liés et le Tamiflu[®] n'ayant pas d'effet inhibiteur sur le développement des calcifications, c'est un autre processus qui pourrait être modifié. Dans ce cadre, la sécrétion d'élastases autres que la CathS pourrait être un candidat intéressant. En effet, une étude a démontré que l'injection de BA4 dans le cadre du syndrome de Marfan conduit à une diminution de l'expression de la MMP-2 et de la MMP-9, corrélée à une diminution de la fragmentation des fibres élastiques. De plus, nous avons montré que des EDPs bioactifs peuvent induire l'expression de ces deux métalloprotéinases (183). Il serait ainsi tout à fait logique que l'inhibition de Neu-1 par le Tamiflu[®] puisse bloquer l'expression de ces

protéases et comme nous l'avons évoqué un peu plus haut dans cette discussion, l'existence d'un réseau de protéases MMP-9/MMP-2/CathS au cours de l'IRC (173) renforcerait cette hypothèse. La dégradation des fibres élastiques étant un paramètre qui influence la rigidité artérielle aortique au cours de l'IRC, (174), l'inhibition de la production de MMP-9 et MMP-2, pourrait donc, du moins en partie, expliquer la diminution bénéfique de la vitesse d'onde de pouls, reflet de la rigidité artérielle, observée avec le Tamiflu®. Enfin, au cours de l'IRC, la rigidité artérielle est la cause principale des modifications structurales du cœur. Elle cause notamment une hypertrophie du ventricule gauche (HVG) dès les stades précoces de la maladie (389) qui est retrouvée dans 70 % à 80 % des patients débutant la dialyse (424). Les conséquences cardiaques de cette HVG sont nombreuses avec notamment l'augmentation du risque d'arythmies, de mort subite ou encore d'insuffisance cardiaque (425). De ce fait, le Tamiflu® en limitant la rigidité artérielle pourrait également réduire le développement de la HVG ce qui pourrait alors freiner les risques d'arythmie chez nos animaux traités comparés aux souris urémiques sans traitement. Cette hypothèse impliquant MMP-9, MMP-2, diminution de l'élastolyse et réduction de la HVG pourrait être analysée en examinant l'activité des MMPs *in vivo* par l'utilisation de la sonde FMT *MMPsense* puis confirmée par l'étude histologique de leur l'expression. L'évaluation de l'élastolyse serait également réalisée par la mesure du dénombrement des fractures au sein des fibres élastiques et la rigidité de la paroi et des fibres élastiques évalués par AFM. L'utilisation de l'IRM nous permettrait d'obtenir des informations précises sur la HVG ainsi que sur la structure générale du cœur et son fonctionnement

En conclusion de ce travail de thèse, nous avons mis évidence que l'axe RAGE/CathS/EDPs est primordial dans le développement des calcifications vasculaires au cours de l'IRC. Cette étude a également en lumière que le CRE pourrait constituer une cible pharmacologique innovante et pertinente dans la lutte contre cette complication vasculaire qui est aujourd'hui encore la principale cause de mortalité chez les patients atteints d'IRC.

Communications

VI. Communications

● Communications affichées

Vascular calcifications during chronic kidney disease: role of the RAGE/Cathepsin S/elastin peptides axis.

Wahart A, Ortillon J, Belmokhtar K, Schmelzer C, Heinz A, Velard F, Boulagnon-Rombi C, Romier-Crouzet B, El Btaouri H, Blaise S, Maurice P, Bennasroune A, Debelle L, Gillery P, Rieu P, Touré F*, Duca L*

Internationales

⇒ Matrix Biology Europe. Manchester. (United Kingdom, 2018).

⇒ 6^{ème} FEBS Advanced Lecture Course - Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets. Patras (Grèce, 25 au 30 mai 2017).

Nationales

⇒ Congrès Annuel de la Nouvelle Société Francophone Athérosclérose. (Biarritz, 20 au 22 juin 2018)

⇒ Journée doctorale transfrontalière. (Reims, 7 mars 2018)

⇒ Congrès Annuel de la Société Française de Biologie de Matrice Extracellulaire. (Marseille ; 16 au 17 mars 2017 et 15 au 17 mai 2019)

Prix du meilleur poster du congrès

● Communications orales

Vascular calcifications during chronic kidney disease: role of the RAGE/Cathepsin S/elastin peptides axis.

Wahart A, Ortillon J, Belmokhtar K, Schmelzer C, Heinz A, Velard F, Boulagnon-Rombi C, Romier-Crouzet B, El Btaouri H, Blaise S, Maurice P, Bennasroune A, Debelle L, Gillery P, Rieu P, Touré F*, Duca L*

Nationales

⇒ Congrès Annuel du LIAC combiné à l'école d'hiver VIVA. (Bordeaux, 29 novembre au 1^{er} décembre 2017).

⇒ Congrès Annuel de la Nouvelle Société Francophone Athérosclérose. (Biarritz, 21 au 23 juin 2017).

Prix de la meilleure communication orale du congrès

○ Publications

- ***Vascular calcifications during chronic kidney disease: role of the RAGE/Cathepsin S/elastin peptides axis.***
Wahart A, Ortillon J, Belmokhtar K, Schmelzer C, Heinz A, Velard F, Boulagnon-Rombi C, Romier-Crouzet B, El Btaouri H, Blaise S, Maurice P, Bennasroune A, Debelle L, Gillery P, Rieu P, Touré F, Duca L (manuscrit en preparation)

- ***Role of elastin peptides and elastin receptor complex in metabolic and cardiovascular diseases.***
Wahart A, Hocine T, Albrecht C, Henry A, Sarazin T, Martiny L, El Btaouri H, Maurice P, Bennasroune A, Romier-Crouzet B, Blaise S, Duca L. FEBS J. 2019 Apr 4.

- ***Identification of CD36 as a new interaction partner of membrane NEU1: potential implication in the pro-atherogenic effects of the elastin receptor complex.***
Kawecki C, Bocquet O, Schmelzer CEH, Heinz A, Ihling C, Wahart A, Romier B, Bennasroune A, Blaise S, Terry C, Linton KJ, Martiny L, Duca L, Maurice P. Cell Mol Life Sci. 2019 Feb;76(4):791-807.

- ***Cellular cholesterol distribution influences proteolytic release of the LRP-1 ectodomain.***
Dekky B, Wahart A, Sartelet H, Féré M, Angiboust JF, Dedieu S, Piot O, Devy J, Emonard H. Front. Pharmacol, 12; 7:25, 2016.

- ***Ethoxyfagaronine, a synthetic analogue of fagaronine that inhibits vascular endothelial growth factor-1, as a new anti-angiogenic agent.***
Ouchani F, Jeanne A, Thevenard J, Helesbeux JJ, Wahart A, Letinois I, Duval O, Martiny L, Charpentier E, Devy J. Invest. New Drugs, 33(1):75-85, 2015

Références bibliographiques

VII. Références bibliographiques

1. McMahon AP. Development of the Mammalian Kidney. *Curr Top Dev Biol.* 2016;117:31-64.
2. Lee SH, Lee JB, Bae MS, Balikov DA, Hwang A, Boire TC, et al. Current Progress in Nanotechnology Applications for Diagnosis and Treatment of Kidney Diseases. *Adv Healthc Mater.* 16 sept 2015;4(13):2037-45.
3. Romagnani P, Remuzzi G, Glasscock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers.* 23 nov 2017;3:17088.
4. Levin A, Tonelli M, Bonventre J, Coresh J, Donner J-A, Fogo AB, et al. Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy. *The Lancet.* 21 oct 2017;390(10105):1888-917.
5. Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, et al. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet.* 16 mai 2015;385(9981):1975-82.
6. Synthèse du rapport annuel du réseau REIN - Aurar [Internet]. [cité 24 févr 2019]. Disponible sur: <http://www.aurar.fr/synthese-du-rapport-annuel-du-reseau-rein>
7. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. 2009
8. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* déc 1998;9(12 Suppl):S16-23.
9. Cai Q, K Mukku V, Ahmad M. Coronary artery disease in patients with chronic kidney disease: a clinical update. *Current cardiology reviews.* 2013;9(4):331–339.
10. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation.* 11 mai 1999;99(18):2434-9.
11. London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant.* sept 2003;18(9):1731-40.
12. Toussaint J-F, Jacob MP, Lagrost L, Chapman J. L'athérosclérose. Physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques. Masson; 2003
13. Cottart CH, Laguillier C, Nivet-Antoine V, Klimczak C, Sebban C, Beaudeau JL. [Biology of arterial ageing and arteriosclerosis]. *C R Biol.* mai 2009;332(5):433-47.
14. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiological Reviews.* 1 juill 2009;89(3):957-89.

15. Deanfield John E., Halcox Julian P., Rabelink Ton J. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation*. 13 mars 2007;115(10):1285-95.
16. van Hinsbergh VWM. Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol*. janv 2012;34(1):93-106.
17. Palade GE, Simionescu M, Simionescu N. Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1979;463:11-32.
18. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. déc 2002;34(12):1508-12.
19. Ponticos M, Smith BD. Extracellular matrix synthesis in vascular disease: hypertension, and atherosclerosis. *J Biomed Res*. janv 2014;28(1):25-39.
20. Seidel CL. Cellular heterogeneity of the vascular tunica media. Implications for vessel wall repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. oct 1997;17(10):1868-71.
21. Stegemann JP, Hong H, Nerem RM. Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *Journal of Applied Physiology*. 1 juin 2005;98(6):2321-7.
22. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol*. 1 nov 2008;586(Pt 21):5047-61.
23. Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther*. mars 1999;79(3):308-19.
24. Tanzer ML. Current concepts of extracellular matrix. *J Orthop Sci*. mai 2006;11(3):326-31.
25. Mecham R. *The Extracellular Matrix: an Overview*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2011
26. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mars 2007;8(3):221-33.
27. Sukhova GK, Shi G-P, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;102(3):576.
28. Moses MA, Marikovsky M, Harper JW, Vogt P, Eriksson E, Klagsbrun M, et al. Temporal study of the activity of matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1996;60(3):379-86.
29. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1 juill 2003;57(5):195-202.

30. Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo J-L, Rusanescu G, Iwamoto Y, et al. Arterial and Aortic Valve Calcification Abolished by Elastolytic Cathepsin S Deficiency in Chronic Renal Disease. *Circulation*. 7 avr 2009;119(13):1785-94.
31. Grande-Allen KJ, Osman N, Ballinger ML, Dadlani H, Marasco S, Little PJ. Glycosaminoglycan synthesis and structure as targets for the prevention of calcific aortic valve disease. *Cardiovasc Res*. 1 oct 2007;76(1):19-28.
32. Prydz K, Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci*. janv 2000;113 Pt 2:193-205.
33. Yoon JH, Halper J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. mars 2005;5(1):22-34.
34. Jacob M-P. [Extracellular matrix and vascular ageing]. *Med Sci (Paris)*. mars 2006;22(3):273-8.
35. El azreq M-A, Bourgoin SG. Cytohesin-1 regulates human blood neutrophil adhesion to endothelial cells through $\beta 2$ integrin activation. *Molecular Immunology*. 1 juill 2011;48(12):1408-16.
36. Martins PA da C, Gils JM van, Mol A, Hordijk PL, Zwaginga JJ. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006;79(3):499-507.
37. Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest*. oct 1994;94(4):1597-604.
38. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 janv 2011;3(1):a004978.
39. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:929-58.
40. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 28 nov 2003;55(12):1531-46.
41. Wu J-J, Weis MA, Kim LS, Eyre DR. Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage. *J Biol Chem*. 11 juin 2010;285(24):18537-44.
42. Howard PS, Macarak EJ. Localization of collagen types in regional segments of the fetal bovine aorta. *Lab Invest*. nov 1989;61(5):548-55.
43. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *The Extracellular Matrix of Animals. Molecular Biology of the Cell* 4th edition. 2002
44. Ponticos M, Partridge T, Black CM, Abraham DJ, Bou-Gharios G. Regulation of Collagen Type I in Vascular Smooth Muscle Cells by Competition between Nkx2.5 and δ EF1/ZEB1. *Mol Cell Biol*. juill 2004;24(14):6151-61.

45. Mizuno K, Boudko S, Engel J, Bächinger HP. Vascular Ehlers-Danlos Syndrome Mutations in Type III Collagen Differently Stall the Triple Helical Folding. *J Biol Chem.* 28 juin 2013;288(26):19166-76.
46. Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. *Advances in protein chemistry.* 2005;70:437–461.
47. Duca L, Floquet N, Alix AJP, Haye B, Debelle L. Elastin as a matrikine. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 1 mars 2004;49(3):235-44.
48. Wagenseil JE, Mecham RP. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today.* déc 2007;81(4):229-40.
49. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci.* 15 juill 2002;115(Pt 14):2817-28.
50. Uitto J, Christiano AM, Kähäri V-M, Bashir MM, Rosenbloom J. Molecular biology and pathology of human elastin. *Biochemical Society Transactions.* 1 nov 1991;19(4):824-9.
51. Swee MH, Parks WC, Pierce RA. Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels. *J Biol Chem.* 23 juin 1995;270(25):14899-906.
52. Fazio MJ, Mattei MG, Passage E, Chu ML, Black D, Solomon E, et al. Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7. *American Journal of Human Genetics.* avr 1991;48(4):696.
53. Sato F, Wachi H, Starcher BC, Murata H, Amano S, Tajima S, et al. The characteristics of elastic fiber assembled with recombinant tropoelastin isoform. *Clinical Biochemistry.* 1 juill 2006;39(7):746-53.
54. Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Sheppard P, Anderson N, Rosenbloom JC, et al. Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* août 1987;84(16):5680-4.
55. Parks WC, Deak SB. Tropoelastin heterogeneity: implications for protein function and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mai 1990;2(5):399-406.
56. Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 1 févr 1999;31(2):261-72.
57. Bax DV, Rodgers UR, Bilek MMM, Weiss AS. Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRR motif and integrin alphaVbeta3. *J Biol Chem.* 16 oct 2009;284(42):28616-23.
58. Hämäläinen ER, Kemppainen R, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. Structure of the human lysyl oxidase gene. *Genomics.* sept 1993;17(3):544-8.
59. Bashir MM, Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Rosenbloom JC, Abrams W, et al. Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region. *J Biol Chem.* 25 mai 1989;264(15):8887-91.

60. Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J.* oct 1993;7(13):1208-18.
61. Rosenbloom J, Bashir M, Yeh H, Rosenbloom J, Ornstein-Goldstein N, Fazio M, et al. Regulation of elastin gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;624:116-36.
62. Perrin S, Foster JA. Developmental regulation of elastin gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1997;7(1-2):1-10.
63. Carreras I, Rich CB, Panchenko MP, Foster JA. Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription in aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem.* 2002;85(3):592-600.
64. Grosso LE, Mecham RP. In vitro processing of tropoelastin: investigation of a possible transport function associated with the carboxy-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 juin 1988;153(2):545-51.
65. Ramamurthi A, Kothapalli C. *Elastic Fiber Matrices: Biomimetic Approaches to Regeneration and Repair.* CRC Press; 2018. 341 p.
66. Hinek A, Rabinovitch M. 67-kD elastin-binding protein is a protective « companion » of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol.* juill 1994;126(2):563-74.
67. Privitera S, Prody CA, Callahan JW, Hinek A. The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J Biol Chem.* 13 mars 1998;273(11):6319-26.
68. Hinek A, Keeley FW, Callahan J. Recycling of the 67-kDa elastin binding protein in arterial myocytes is imperative for secretion of tropoelastin. *Exp Cell Res.* oct 1995;220(2):312-24.
69. Rock MJ, Cain SA, Freeman LJ, Morgan A, Mellody K, Marson A, et al. Molecular Basis of Elastic Fiber Formation CRITICAL INTERACTIONS AND A TROPOELASTIN-FIBRILLIN-1 CROSS-LINK. *J Biol Chem.* 28 mai 2004;279(22):23748-58.
70. Clarke AW, Weiss AS. Microfibril-associated glycoprotein-1 binding to tropoelastin: multiple binding sites and the role of divalent cations. *Eur J Biochem.* juill 2004;271(14):3085-90.
71. Kozel BA, Rongish BJ, Czirok A, Zach J, Little CD, Davis EC, et al. Elastic fiber formation: A dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. *Journal of Cellular Physiology.* 1 avr 2006;207(1):87-96.
72. Vrhovski B, Jensen S, Weiss AS. Coacervation Characteristics of Recombinant Human Tropoelastin. *European Journal of Biochemistry.* 1 nov 1997;250(1):92-8.
73. Yeo GC, Keeley FW, Weiss AS. Coacervation of tropoelastin. *Advances in Colloid and Interface Science.* 14 sept 2011;167(1):94-103.

74. Noblesse E, Cenizo V, Bouez C, Borel A, Gleyzal C, Peyrol S, et al. Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J Invest Dermatol.* mars 2004;122(3):621-30.
75. Schmelzer CEH, Heinz A, Troilo H, Lockhart-Cairns MP, Jowitt TA, Marchand MF, et al. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)-mediated cross-linking of tropoelastin. *The FASEB Journal.* avr 2019;33(4):5468.
76. Kagan HM, Sullivan KA. Lysyl oxidase: preparation and role in elastin biosynthesis. *Meth Enzymol.* 1982;82 Pt A:637-50.
77. Oitate M, Hirota T, Takahashi M, Murai T, Miura S, Senoo A, et al. Mechanism for Covalent Binding of Rofecoxib to Elastin of Rat Aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 1 mars 2007;320(3):1195-203.
78. Clarke AW, Arnsfang EC, Mithieux SM, Korkmaz E, Braet F, Weiss AS. Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres. *Biochemistry.* 22 août 2006;45(33):9989-96.
79. Umeda H, Aikawa M, Libby P. Liberation of desmosine and isodesmosine as amino acids from insoluble elastin by elastolytic proteases. *Biochem Biophys Res Commun.* 29 juill 2011;411(2):281-6.
80. Kagan HM, Cai P. Isolation of active site peptides of lysyl oxidase. *Meth Enzymol.* 1995;258:122-32.
81. Partridge SM, Elsdon DF, Thomas J, Dorfman A, Telser A, Ho PL. Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in elastin. *Biochem J.* déc 1964;93(3):30C-33C.
82. Vrhovski B, Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem.* 15 nov 1998;258(1):1-18.
83. Brown-Augsburger P, Tisdale C, Broekelmann T, Sloan C, Mecham RP. Identification of an elastin cross-linking domain that joins three peptide chains. Possible role in nucleated assembly. *J Biol Chem.* 28 juill 1995;270(30):17778-83.
84. Weihermann AC, Lorencini M, Brohem CA, de Carvalho CM. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *International Journal of Cosmetic Science.* juin 2017;39(3):241-7.
85. Xu J, Shi G-P. Vascular wall extracellular matrix proteins and vascular diseases. *Biochim Biophys Acta.* nov 2014;1842(11):2106-19.
86. Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol.* déc 1986;103(6 Pt 1):2499-509.
87. Knott V, Downing AK, Cardy CM, Handford P. Calcium binding properties of an epidermal growth factor-like domain pair from human fibrillin-1. *J Mol Biol.* 12 janv 1996;255(1):22-7.

88. Jovanovic J, Takagi J, Choulier L, Abrescia NGA, Stuart DI, van der Merwe PA, et al. alphaVbeta6 is a novel receptor for human fibrillin-1. Comparative studies of molecular determinants underlying integrin-rgd affinity and specificity. *J Biol Chem.* 2 mars 2007;282(9):6743-51.
89. Sakamoto H, Broekelmann T, Cheresh DA, Ramirez F, Rosenbloom J, Mecham RP. Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J Biol Chem.* 1 mars 1996;271(9):4916-22.
90. Ritty TM, Broekelmann TJ, Werneck CC, Mecham RP. Fibrillin-1 and -2 contain heparin-binding sites important for matrix deposition and that support cell attachment. *Biochem J.* 15 oct 2003;375(Pt 2):425-32.
91. Davis MR, Summers KM. Structure and function of the mammalian fibrillin gene family: implications for human connective tissue diseases. *Mol Genet Metab.* déc 2012;107(4):635-47.
92. Taipale J, Saharinen J, Hedman K, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem.* août 1996;44(8):875-89.
93. Mariencheck MC, Davis EC, Zhang H, Ramirez F, Rosenbloom J, Gibson MA, et al. Fibrillin-1 and fibrillin-2 show temporal and tissue-specific regulation of expression in developing elastic tissues. *Connect Tissue Res.* 1995;31(2):87-97.
94. Robinson PN, Godfrey M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. *J Med Genet.* janv 2000;37(1):9-25.
95. Lin G, Tiedemann K, Vollbrandt T, Peters H, Batge B, Brinckmann J, et al. Homo- and heterotypic fibrillin-1 and -2 interactions constitute the basis for the assembly of microfibrils. *J Biol Chem.* 27 déc 2002;277(52):50795-804.
96. Tunçbilek E, Alanay Y. Congenital contractural arachnodactyly (Beals syndrome). *Orphanet J Rare Dis.* 1 juin 2006;1:20.
97. Quondamatteo F, Reinhardt DP, Charbonneau NL, Pophal G, Sakai LY, Herken R. Fibrillin-1 and fibrillin-2 in human embryonic and early fetal development. *Matrix Biol.* déc 2002;21(8):637-46.
98. Gibson MA, Finnis ML, Kumaratilake JS, Cleary EG. Microfibril-associated glycoprotein-2 (MAGP-2) is specifically associated with fibrillin-containing microfibrils but exhibits more restricted patterns of tissue localization and developmental expression than its structural relative MAGP-1. *J Histochem Cytochem.* août 1998;46(8):871-86.
99. Henderson M, Polewski R, Fanning JC, Gibson MA. Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) is specifically located on the beads of the beaded-filament structure for fibrillin-containing microfibrils as visualized by the rotary shadowing technique. *J Histochem Cytochem.* déc 1996;44(12):1389-97.
100. Jensen SA, Reinhardt DP, Gibson MA, Weiss AS. Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1. *J Biol Chem.* 26 oct 2001;276(43):39661-6.

101. Lemaire R, Bayle J, Mecham RP, Lafyatis R. Microfibril-associated MAGP-2 stimulates elastic fiber assembly. *J Biol Chem.* 5 janv 2007;282(1):800-8.
102. Argraves WS, Greene LM, Cooley MA, Gallagher WM. Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Rep.* déc 2003;4(12):1127-31.
103. Timpl R, Sasaki T, Kostka G, Chu M-L. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juin 2003;4(6):479-89.
104. Roark EF, Keene DR, Haudenschild CC, Godyna S, Little CD, Argraves WS. The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study. *J Histochem Cytochem.* avr 1995;43(4):401-11.
105. Sasaki T, Göhring W, Miosge N, Abrams WR, Rosenbloom J, Timpl R. Tropoelastin binding to fibulins, nidogen-2 and other extracellular matrix proteins. *FEBS Lett.* 29 oct 1999;460(2):280-4.
106. Reinhardt DP, Sasaki T, Dzamba BJ, Keene DR, Chu ML, Göhring W, et al. Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *J Biol Chem.* 9 août 1996;271(32):19489-96.
107. Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, et al. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature.* 10 2002;415(6868):171-5.
108. Doliana R, Mongiat M, Bucciotti F, Giacomello E, Deutzmann R, Volpin D, et al. EMILIN, a component of the elastic fiber and a new member of the C1q/tumor necrosis factor superfamily of proteins. *J Biol Chem.* 11 juin 1999;274(24):16773-81.
109. Bressan GM, Daga-Gordini D, Colombatti A, Castellani I, Marigo V, Volpin D. Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *J Cell Biol.* avr 1993;121(1):201-12.
110. Zanetti M, Braghetta P, Sabatelli P, Mura I, Doliana R, Colombatti A, et al. EMILIN-1 Deficiency Induces Elastogenesis and Vascular Cell Defects. *Mol Cell Biol.* janv 2004;24(2):638-50.
111. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA.* 1 déc 1999;282(21):2035-42.
112. Davies PF, Civelek M, Fang Y, Fleming I. The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovasc Res.* 15 juill 2013;99(2):315-27.
113. Frueh J, Maimari N, Homma T, Bovens SM, Pedrighi RM, Towhidi L, et al. Systems biology of the functional and dysfunctional endothelium. *Cardiovasc Res.* 15 juill 2013;99(2):334-41.
114. Hurt E, Bondjers G, Camejo G. Interaction of LDL with human arterial proteoglycans stimulates its uptake by human monocyte-derived macrophages. *J Lipid Res.* mars 1990;31(3):443-54.

115. Chisolm GM, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The Oxidation of Lipoproteins by Monocytes-Macrophages BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL MECHANISMS. *J Biol Chem.* 9 oct 1999;274(37):25959-62.
116. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest.* août 1993;92(2):945-51.
117. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1 juill 1998;102(1):145-52.
118. Insull W. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *The American Journal of Medicine.* 1 janv 2009;122(1):S3-14.
119. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* mars 2000;247(3):349-58.
120. Ang AH, Tachas G, Campbell JH, Bateman JF, Campbell GR. Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem J.* 15 janv 1990;265(2):461-9.
121. Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Di Q, Liu Z, Sasaki T, et al. Localization of Cysteine Protease, Cathepsin S, to the Surface of Vascular Smooth Muscle Cells by Association with Integrin $\alpha\beta 3$. *Am J Pathol.* févr 2006;168(2):685-94.
122. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* déc 1994;94(6):2493-503.
123. Raines EW, Ferri N. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *J Lipid Res.* juin 2005;46(6):1081-92.
124. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 nov 2003;100(23):13531-6.
125. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *Int J Prev Med.* août 2014;5(8):927-46.
126. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory Enlargement of Human Atherosclerotic Coronary Arteries. *New England Journal of Medicine.* 28 mai 1987;316(22):1371-5.
127. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* mai 2011;473(7347):317-25.
128. Tsukada T, Rosenfeld M, Ross R, Gown AM. Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis.* déc 1986;6(6):601-13.

129. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J, et al. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation*. 20 févr 2001;103(7):934-40.
130. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis: A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1 sept 1995;92(5):1355-74.
131. Parikh P, Shah N, Ahmed H, Schoenhagen P, Fares M. Coronary artery calcium scoring: Its practicality and clinical utility in primary care. *Cleve Clin J Med*. sept 2018;85(9):707-16.
132. Drüeke TB, Massy ZA. Atherosclerosis in CKD: differences from the general population. *Nature Reviews Nephrology*. déc 2010;6(12):723-35.
133. Nakano T, Ninomiya T, Sumiyoshi S, Fujii H, Doi Y, Hirakata H, et al. Association of Kidney Function With Coronary Atherosclerosis and Calcification in Autopsy Samples From Japanese Elders: The Hisayama Study. *American Journal of Kidney Diseases*. 1 janv 2010;55(1):21-30.
134. London GM, Drüeke TB. Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. *Kidney International*. 1 juin 1997;51(6):1678-95.
135. Jungers P, Massy ZA, Nguyen Khoa T, Fumeron C, Labrunie M, Lacour B, et al. Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant*. déc 1997;12(12):2597-602.
136. Takagi M, Wada H, Mukai K, Kihira H, Yano S, Minamikawa K, et al. Increased vascular endothelial cell markers in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. oct 1994;5(5):713-7.
137. Dursun I, Poyrazoglu HM, Gunduz Z, Ulger H, Yýkýlmaz A, Dusunsel R, et al. The relationship between circulating endothelial microparticles and arterial stiffness and atherosclerosis in children with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 1 août 2009;24(8):2511-8.
138. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. mars 2009;13(3):454-71.
139. Jourde-Chiche N, Dou L, Sabatier F, Calaf R, Cerini C, Robert S, et al. Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients. *J Thromb Haemost*. sept 2009;7(9):1576-84.
140. Suliman ME, Stenvinkel P. Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. mai 2008;19(3):329-45.

141. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney International*. 1 févr 1999;55(2):648-58.
142. Jofré R, Rodriguez-Benitez P, López-Gómez JM, Pérez-García R. Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*. déc 2006;17(12 Suppl 3):S274-280.
143. Weichhart T, Kopecky C, Kubicek M, Haidinger M, Döller D, Katholnig K, et al. Serum amyloid A in uremic HDL promotes inflammation. *J Am Soc Nephrol*. mai 2012;23(5):934-47.
144. Lavín-Gómez BA, Palomar-Fontanet R, Gago-Fraile M, Quintanar-Lartundo JA, Gómez-Palomo E, González-Lamuño D, et al. Inflammation markers, chronic kidney disease, and renal replacement therapy. *Adv Perit Dial*. 2011;27:33-7.
145. Pereira BJG, Shapiro L, King AJ, Falagas ME, Strom JA, Dinarello CA. Plasma levels of IL-1 β , TNF α and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney International*. mars 1994;45(3):890-6.
146. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia—The good, the bad, and the ugly. *Kidney International*. 1 avr 2005;67(4):1216-33.
147. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate. *Circulation Research*. 2 sept 2011;109(6):697-711.
148. Allison MA, Criqui MH, Wright CM. Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. févr 2004;24(2):331-6.
149. Zhu D, Mackenzie NCW, Farquharson C, MacRae VE. Mechanisms and Clinical Consequences of Vascular Calcification. *Frontiers in Endocrinology*. 2012
150. Stary HC. Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression. *Z Kardiol*. 2000;89 Suppl 2:28-35.
151. Yu SY. Calcification Processes in Atherosclerosis. In: Wagner WD, Clarkson TB, éditeurs. *Arterial Mesenchyme and Arteriosclerosis*. Boston, MA: Springer US; 1974 [cité 23 févr 2019]. p. 403-25. (Advances in Experimental Medicine and Biology).
152. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1 mai 2004;286(5):E686-96.
153. 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*. avr 1996;16(4):523-32.

154. Olsson M, Dalsgaard CJ, Haegerstrand A, Rosenqvist M, Rydén L, Nilsson J. Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol.* avr 1994;23(5):1162-70.
155. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation.* 6 mai 2003;107(17):2181-4.
156. Qunibi WY, Nolan CA, Ayus JC. Cardiovascular calcification in patients with end-stage renal disease: a century-old phenomenon. *Kidney Int Suppl.* déc 2002;(82):S73-80.
157. Mwiratayi BP, Cooke C, Sinniah RH, Abbas M, Angel D, Sieunarine K. Calciphylaxis: emerging concept in vascular patients. *Eur J Dermatol.* févr 2007;17(1):73-8.
158. Russo D, Palmiero G, De Blasio AP, Balletta MM, Andreucci VE. Coronary artery calcification in patients with CRF not undergoing dialysis. *Am J Kidney Dis.* déc 2004;44(6):1024-30.
159. Raggi P, Boulay A, Chasan-Taber S, Amin N, Dillon M, Burke SK, et al. Cardiac calcification in adult hemodialysis patients: A link between end-stage renal disease and cardiovascular disease? *Journal of the American College of Cardiology.* 20 févr 2002;39(4):695-701.
160. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension.* oct 2001;38(4):938-42.
161. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Wolisi GO, Koczman JJ, Laclair R, et al. The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* sept 2006;70(6):1046-53.
162. Byon CH, Chen Y. Molecular Mechanisms of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: The Link between Bone and the Vasculature. *Curr Osteoporos Rep.* août 2015;13(4):206-15.
163. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation research.* 2000;87(7):e10-e17.
164. Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H. Vascular calcification and inorganic phosphate. *American Journal of Kidney Diseases.* 1 oct 2001;38(4, Supplement):S34-7.
165. Takeda E, Taketani Y, Morita K, Miyamoto K. Sodium-dependent phosphate co-transporters. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 1 mars 1999;31(3):377-81.
166. Werner A, Dehmelt L, Nalbant P. Na⁺-dependent phosphate cotransporters: the NaPi protein families. *Journal of Experimental Biology.* 1 déc 1998;201(23):3135-42.

167. Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, Koiwa F, Saji F, Shiizaki K, et al. Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant.* avr 2006;21(4):911-6.
168. Li X, Yang H-Y, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 14 avr 2006;98(7):905-12.
169. Giachelli CM. Vascular Calcification: In Vitro Evidence for the Role of Inorganic Phosphate. *JASN.* 9 janv 2003;14(suppl 4):S300-4.
170. Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene.* 10 mai 2006;372:62-70.
171. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Böhm R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet.* 8 mars 2003;361(9360):827-33.
172. Massy ZA. Uremia Accelerates both Atherosclerosis and Arterial Calcification in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Journal of the American Society of Nephrology.* 1 déc 2004;16(1):109-16.
173. Pai A, Leaf EM, El-Abbadi M, Giachelli CM. Elastin Degradation and Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Change Precede Cell Loss and Arterial Medial Calcification in a Uremic Mouse Model of Chronic Kidney Disease. *The American Journal of Pathology.* févr 2011;178(2):764-73.
174. Smith ER, Tomlinson LA, Ford ML, McMahon LP, Rajkumar C, Holt SG. Elastin degradation is associated with progressive aortic stiffening and all-cause mortality in predialysis chronic kidney disease. *Hypertension.* 2012;HYPERTENSIONAHA-111.
175. Figueiredo J-L, Aikawa M, Zheng C, Aaron J, Lax L, Libby P, et al. Selective cathepsin S inhibition attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with chronic renal disease. *The American journal of pathology.* 2015;185(4):1156-1166.
176. Shapiro SD, Endicott SK, Province MA, Pierce JA, Campbell EJ. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest.* mai 1991;87(5):1828-34.
177. Hornebeck W, Derouette JC, Roland J, Châtelet F, Bouissou H, Robert L. [Correlation between age, arteriosclerosis and elastolytic activity of human aorta wall]. *CR Hebd Seances Acad Sci, Ser D, Sci Nat.* 14 juin 1976;282(22):2003-6.
178. Antonicelli F, Bellon G, Debelle L, Hornebeck W. Elastin-Elastases and Inflamm-Aging. In: *Current Topics in Developmental Biology.* Academic Press; 2007
179. Qin Z. Soluble elastin peptides in cardiovascular homeostasis: Foe or ally. *Peptides.* mai 2015;67:64-73.
180. Schmelzer CEH, Jung MC, Wohlrab J, Neubert RHH, Heinz A. Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin? *The FEBS Journal.* 1 nov 2012;279(22):4191-200.

181. Novinec M, Grass RN, Stark WJ, Turk V, Baici A, Lenarčič B. Interaction between Human Cathepsins K, L, and S and Elastins: MECHANISM OF ELASTINOLYSIS AND INHIBITION BY MACROMOLECULAR INHIBITORS. *Journal of Biological Chemistry*. 16 mars 2007;282(11):7893-902.
182. Liu J. Lysosomal Cysteine Proteases in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 17 juin 2004;24(8):1359-66.
183. Heinz A, Jung MC, Duca L, Sippl W, Taddese S, Ihling C, et al. Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases--cleavage site specificities and release of matrikines. *FEBS J*. avr 2010;277(8):1939-56.
184. Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJ. Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J*. 1 juill 1991;277(Pt 1):277-9.
185. Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem*. 25 avr 1991;266(12):7870-5.
186. Taddese S, Weiss AS, Neubert RHH, Schmelzer CEH. Mapping of macrophage elastase cleavage sites in insoluble human skin elastin. *Matrix Biology*. 1 juin 2008;27(5):420-8.
187. Maquart F-X, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse J-C. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol*. mars 2004;49(3):199-202.
188. Partridge SM, Davis HF, Adair GS. The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin. *Biochem J*. sept 1955;61(1):11-21.
189. Jacob M, Hornebeck W. Isolation and characterization of insoluble and kappa elastins. Robert, L, M Moczar And E Moczar (Ed) *Frontiers Of Matrix Biology, Vol 10 Methods Of Connective Tissue Research Xiv+248p S Karger*. 1985
190. Moroy G, Alix AJP, Héry-Huynh S. Structural characterization of human elastin derived peptides containing the GXXP sequence. *Biopolymers*. juill 2005;78(4):206-20.
191. Gayral S, Garnotel R, Castaing-Berthou A, Blaise S, Fougerat A, Berge E, et al. Elastin-derived peptides potentiate atherosclerosis through the immune Neu1-PI3K γ pathway. *Cardiovasc Res*. 1 avr 2014;102(1):118-27.
192. Tajima S, Wachi H, Uemura Y, Okamoto K. Modulation by elastin peptide VGVAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res*. juill 1997;289(8):489-92.
193. Long MM, King VJ, Prasad KU, Freeman BA, Urry DW. Elastin repeat peptides as chemoattractants for bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol*. sept 1989;140(3):512-8.

194. Heinz A, Jung MC, Jahreis G, Rusciani A, Duca L, Debelle L, et al. The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. *Biochimie.* janv 2012;94(1):192-202.
195. Brassart B, Fuchs P, Huet E, Alix AJ, Wallach J, Tamburro AM, et al. Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts. *J Biol Chem.* 16 févr 2001;276(7):5222-7.
196. Ochieng J, Warfield P, Green-Jarvis B, Fentie I. Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin. *J Cell Biochem.* 1 déc 1999;75(3):505-14.
197. Rodgers UR, Weiss AS. Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin. *Biochimie.* mars 2004;86(3):173-8.
198. Patel D, Vandromme SE, Reid ME, Taite LJ. Synergistic activity of $\alpha\beta 3$ integrins and the elastin binding protein enhance cell-matrix interactions on bioactive hydrogel surfaces. *Biomacromolecules.* 14 mai 2012;13(5):1420-8.
199. Lee P, Bax DV, Bilek MMM, Weiss AS. A novel cell adhesion region in tropoelastin mediates attachment to integrin $\alpha V\beta 5$. *J Biol Chem.* 17 janv 2014;289(3):1467-77.
200. Lee P, Yeo GC, Weiss AS. A cell adhesive peptide from tropoelastin promotes sequential cell attachment and spreading via distinct receptors. *FEBS J.* 2017;284(14):2216-30.
201. Hinek A, Wrenn DS, Mecham RP, Barondes SH. The elastin receptor: a galactoside-binding protein. *Science.* 25 mars 1988;239(4847):1539-41.
202. Duca L, Blanchevove C, Cantarelli B, Ghoneim C, Dedieu S, Delacoux F, et al. The Elastin Receptor Complex Transduces Signals through the Catalytic Activity of Its Neu-1 Subunit. *Journal of Biological Chemistry.* 27 avr 2007;282(17):12484-91.
203. Scandolera A, Odoul L, Salesse S, Guillot A, Blaise S, Kawecki C, et al. The Elastin Receptor Complex: A Unique Matricellular Receptor with High Anti-tumoral Potential. *Front Pharmacol.* 2016;7:32.
204. Hinek A, Rabinovitch M, Keeley F, Okamura-Oho Y, Callahan J. The 67-kD elastin/laminin-binding protein is related to an enzymatically inactive, alternatively spliced form of beta-galactosidase. *J Clin Invest.* mars 1993;91(3):1198-205.
205. Mochizuki S, Brassart B, Hinek A. Signaling Pathways Transduced through the Elastin Receptor Facilitate Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 22 nov 2002;277(47):44854-63.
206. Maurice P, Blaise S, Gayral S, Debelle L, Laffargue M, Hornebeck W, et al. Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: The elastokine concept. *Trends in Cardiovascular Medicine.* août 2013;23(6):211-21.
207. Hiraiwa M. Cathepsin A/protective protein: an unusual lysosomal multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci.* déc 1999;56(11-12):894-907.

208. Morreau H, Galjart NJ, Willemsen R, Gillemans N, Zhou XY, d'Azzo A. Human lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with beta-galactosidase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 5 sept 1992;267(25):17949-56.
209. Hoogeveen AT, Verheijen FW, Galjaard H. The relation between human lysosomal beta-galactosidase and its protective protein. *J Biol Chem.* 25 oct 1983;258(20):12143-6.
210. Callahan JW. Molecular basis of GM1 gangliosidosis and Morquio disease, type B. Structure–function studies of lysosomal β -galactosidase and the non-lysosomal β -galactosidase-like protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 8 oct 1999;1455(2):85-103.
211. Wei M, Wang PG. Desialylation in physiological and pathological processes: New target for diagnostic and therapeutic development. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2019;162:25-57.
212. Monti E, Bonten E, D'Azzo A, Bresciani R, Venerando B, Borsani G, et al. Sialidases in Vertebrates: A Family Of Enzymes Tailored For Several Cell Functions*. In: Horton D, éditeur. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* Academic Press; 2010
213. Verheijen FW, Palmeri S, Hoogeveen AT, Galjaard H. Human placental neuraminidase. Activation, stabilization and association with beta-galactosidase and its protective protein. *Eur J Biochem.* 3 juin 1985;149(2):315-21.
214. Starcher B, d'Azzo A, Keller PW, Rao GK, Nadarajah D, Hinek A. Neuraminidase-1 is required for the normal assembly of elastic fibers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* oct 2008;295(4):L637-647.
215. Blaise S, Romier B, Kawecki C, Ghirardi M, Rabenoelina F, Baud S, et al. Elastin-Derived Peptides Are New Regulators of Insulin Resistance Development in Mice. *Diabetes.* nov 2013;62(11):3807-16.
216. Kawecki C, Bocquet O, Schmelzer CEH, Heinz A, Ihling C, Wahart A, et al. Identification of CD36 as a new interaction partner of membrane NEU1: potential implication in the pro-atherogenic effects of the elastin receptor complex. *Cell Mol Life Sci.* 29 nov 2018;
217. Bonten EJ, Campos Y, Zaitsev V, Nourse A, Waddell B, Lewis W, et al. Heterodimerization of the Sialidase NEU1 with the Chaperone Protective Protein/Cathepsin A Prevents Its Premature Oligomerization. *J Biol Chem.* 9 oct 2009;284(41):28430-41.
218. Fahem A, Robinet A, Cauchard JH, Duca L, Soula-Rothhut M, Rothhut B, et al. Elastokine-mediated up-regulation of MT1-MMP is triggered by nitric oxide in endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(8):1581-96.

219. Robinet A, Millart H, Oszust F, Hornebeck W, Bellon G. Binding of elastin peptides to S-Gal protects the heart against ischemia/reperfusion injury by triggering the RISK pathway. *FASEB J.* juill 2007;21(9):1968-78.
220. Rusciani A, Duca L, Sartelet H, Chatron-Colliet A, Bobichon H, Ploton D, et al. Elastin Peptides Signaling Relies on Neuraminidase-1-Dependent Lactosylceramide Generation. *PLoS One.* 16 nov 2010
221. Duca L, Debelle L, Debret R, Antonicelli F, Hornebeck W, Haye B. The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling. *FEBS Lett.* 31 juill 2002;524(1-3):193-8.
222. Jacob MP, Fülöp T, Foris G, Robert L. Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* févr 1987;84(4):995-9.
223. Jormsjö S, Wuttge DM, Sirsjö A, Whatling C, Hamsten A, Stemme S, et al. Differential expression of cysteine and aspartic proteases during progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of pathology.* 2002;161(3):939–945.
224. Fulop T, Larbi A, Fortun A, Robert L, Khalil A. Elastin peptides induced oxidation of LDL by phagocytic cells. *Pathol Biol.* sept 2005;53(7):416-23.
225. Debret R, Antonicelli F, Theill A, Hornebeck W, Bernard P, Guenounou M, et al. Elastin-derived peptides induce a T-helper type 1 polarization of human blood lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2005;25(7):1353-8.
226. Poggi A, Mingari MC. Development of human NK cells from the immature cell precursors. *Semin Immunol.* avr 1995;7(2):61-6.
227. Ooyama T, Fukuda K, Oda H, Nakamura H, Hikita Y. Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro. *Arteriosclerosis.* déc 1987;7(6):593-8.
228. Simionescu A, Philips K, Vyavahare N. Elastin-derived peptides and TGF- β 1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* août 2005;334(2):524-32.
229. Fülöp T, Wei SM, Robert L, Jacob MP. Determination of elastin peptides in normal and arteriosclerotic human sera by ELISA. *Clin Physiol Biochem.* 1990;8(6):273-82.
230. Baydanoff S, Nicoloff G, Alexiev C. Age-related changes in the level of circulating elastin-derived peptides in serum from normal and atherosclerotic subjects. *Atherosclerosis.* juill 1987;66(1-2):163-8.
231. Luttun A, Lutgens E, Manderveld A, Maris K, Collen D, Carmeliet P, et al. Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation.* 23 mars 2004;109(11):1408-14.

232. Sukhova GK, Zhang Y, Pan J-H, Wada Y, Yamamoto T, Naito M, et al. Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 15 mars 2003;111(6):897-906.
233. Oliveira RB de, Okazaki H, Stinghen AEM, Drüeke TB, Massy ZA, Jorgetti V. Vascular calcification in chronic kidney disease: a review. *Brazilian Journal of Nephrology.* juin 2013;35(2):147-61.
234. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 25 juill 1992;267(21):14987-97.
235. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol.* déc 1993;143(6):1699-712.
236. Collison KS, Parhar RS, Saleh SS, Meyer BF, Kwaasi AA, Hammami MM, et al. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *J Leukoc Biol.* mars 2002;71(3):433-44.
237. Harja E, Bu D, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, et al. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *Journal of Clinical Investigation.* 2 janv 2008;118(1):183-94.
238. Schraml P, Bendik I, Ludwig CU. Differential messenger RNA and protein expression of the receptor for advanced glycosylated end products in normal lung and non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 1 sept 1997;57(17):3669-71.
239. Yan SS, Wu Z-Y, Zhang HP, Furtado G, Chen X, Yan SF, et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. *Nat Med.* mars 2003;9(3):287-93.
240. Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci.* avr 2009;116(8):621-37.
241. Fritz G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends in Biochemical Sciences.* 1 déc 2011;36(12):625-32.
242. Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, et al. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J.* mai 2008;22(5):1572-80.
243. Dattilo BM, Fritz G, Leclerc E, Kooi CWV, Heizmann CW, Chazin WJ. The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry.* 12 juin 2007;46(23):6957-70.
244. Leclerc E, Fritz G, Vetter SW, Heizmann CW. Binding of S100 proteins to RAGE: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1 juin 2009;1793(6):993-1007.

245. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem.* 9 juill 1999;274(28):19919-24.
246. Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, et al. Receptor for Advanced Glycation End Products Is Subjected to Protein Ectodomain Shedding by Metalloproteinases. *J Biol Chem.* 19 déc 2008;283(51):35507-16.
247. Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P, Bullerdiek J. Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms--a result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta.* 20 oct 2003;1630(1):1-6.
248. Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis.* 1 janv 2008;196(1):9-21.
249. Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A. Structural Basis for Pattern Recognition by the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE). *J Biol Chem.* 10 mars 2008;283(40):27255-69.
250. Koch M, Chitayat S, Dattilo BM, Schiefner A, Diez J, Chazin WJ, et al. Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Structure.* 13 oct 2010;18(10):1342-52.
251. Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 27 juin 1997;272(26):16498-506.
252. Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *Journal of Leukocyte Biology.* 1 juill 2013;94(1):55-68.
253. Sterenczak KA, Willenbrock S, Barann M, Klemke M, Soller JT, Eberle N, et al. Cloning, characterisation, and comparative quantitative expression analyses of receptor for advanced glycation end products (RAGE) transcript forms. *Gene.* 1 avr 2009;434(1-2):35-42.
254. Kalea AZ, Reiniger N, Yang H, Arriero M, Schmidt AM, Hudson BI. Alternative splicing of the murine receptor for advanced glycation end-products (RAGE) gene. *FASEB J.* juin 2009;23(6):1766-74.
255. Nishizawa Y, Koyama H. Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End-Products and Cardiovascular Disease in End-Stage Renal Disease. *Journal of Renal Nutrition.* 1 janv 2008;18(1):76-82.
256. Park SJ, Kleffmann T, Hessian PA. The G82S polymorphism promotes glycosylation of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) at asparagine 81: comparison of wild-type rage with the G82S polymorphic variant. *J Biol Chem.* 17 juin 2011;286(24):21384-92.
257. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by

- proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* oct 2008;22(10):3716-27.
258. Galichet A, Weibel M, Heizmann CW. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 23 mai 2008;370(1):1-5.
259. Metz VV, Kojro E, Rat D, Postina R. Induction of RAGE shedding by activation of G protein-coupled receptors. *PLoS ONE.* 2012;7(7):e41823.
260. Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Dietary Advanced Glycation End Products and Aging. *Nutrients.* 13 déc 2010;2(12):1247-65.
261. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J Physiol Pharmacol.* févr 2014;18(1):1-14.
262. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 9 janv 2014;2:411-29.
263. Vallon V, Komers R. Pathophysiology of the Diabetic Kidney. *Compr Physiol.* juill 2011;1(3):1175-232.
264. Miyata T, Wada Y, Cai Z, Iida Y, Horie K, Yasuda Y, et al. Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure. *Kidney Int.* avr 1997;51(4):1170-81.
265. Inagi R. RAGE and glyoxalase in kidney disease. *Glycoconj J.* 2016;33(4):619-26.
266. Yan Shi-Fang, Shen Xiaoping, Rosario Rosa, Schmidt Ann Marie. Abstract 512: RAGE-dependent Down-regulation of Glyoxalase-1 Impairs Inflammatory Response and Angiogenesis in Hind Limb Ischemia in Diabetic Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1 mai 2015;35(suppl_1):A512-A512.
267. Poitou C, Divoux A, Clément K. La sérum amyloïde A : une apolipoprotéine majeure de l'inflammation. *Sang Thrombose Vaisseaux.* 1 juill 2008;20(7):362-8.
268. Artl A, Marsche G, Lestavel S, Sattler W, Malle E. Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mars 2000;20(3):763-72.
269. Targońska-Stępnia B, Majdan M. Serum Amyloid A as a Marker of Persistent Inflammation and an Indicator of Cardiovascular and Renal Involvement in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation.* 2014
270. O'Brien Kevin D., McDonald Thomas O., Kunjathoor Vidya, Eng KimLi, Knopp Eleanor A., Lewis Katherine, et al. Serum Amyloid A and Lipoprotein Retention in Murine Models of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1 avr 2005;25(4):785-90.
271. Belmokhtar K, Robert T, Ortillon J, Braconnier A, Vuiblet V, Boulagnon-Rombi C, et al. Signaling of Serum Amyloid A Through Receptor for Advanced Glycation End

- Products as a Possible Mechanism for Uremia-Related Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mai 2016;36(5):800-9.
272. Cato L, Stott K, Watson M, Thomas JO. The interaction of HMGB1 and linker histones occurs through their acidic and basic tails. *J Mol Biol.* 31 déc 2008;384(5):1262-72.
273. Wittemann B, Neuer G, Michels H, Truckenbrodt H, Bautz FA. Autoantibodies to nonhistone chromosomal proteins HMG-1 and HMG-2 in sera of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* sept 1990;33(9):1378-83.
274. Pullerits R, Jonsson I-M, Verdrengh M, Bokarewa M, Andersson U, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum.* juin 2003;48(6):1693-700.
275. Olejarz W, Łacheta D, Głuszko A, Migacz E, Kukwa W, Szczepański MJ, et al. RAGE and TLRs as Key Targets for Antiatherosclerotic Therapy. *Biomed Res Int.* 26 août 2018
276. Tang D, Kang R, Cheh C-W, Livesey KM, Liang X, Schapiro NE, et al. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene.* 23 sept 2010;29(38):5299-310.
277. Porto A, Palumbo R, Pieroni M, Aprigliano G, Chiesa R, Sanvito F, et al. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. *The FASEB Journal.* 23 oct 2006;20(14):2565-6.
278. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* juill 2001;33(7):637-68.
279. Heizmann CW, Cox JA. New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca²⁺ -, Zn²⁺ - and Cu²⁺ -binding protein family. *Biometals.* 1 déc 1998;11(4):383-97.
280. Vogl T, Pröpper C, Hartmann M, Strey A, Strupat K, Bos C van den, et al. S100A12 Is Expressed Exclusively by Granulocytes and Acts Independently from MRP8 and MRP14. *J Biol Chem.* 9 mars 1999;274(36):25291-6.
281. Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol.* déc 1989;109(6 Pt 1):3063-71.
282. Ambartsumian N, Klingelhöfer J, Grigorian M, Christensen C, Kriajevska M, Tulchinsky E, et al. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene.* 2 août 2001;20(34):4685-95.
283. Schmidt AM, Du Yan S, Yan SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.* 2000;1498(2):99–111.

284. Gawdzik J, Mathew L, Kim G, Puri TS, Hofmann Bowman MA. Vascular Remodeling and Arterial Calcification Are Directly Mediated by S100A12 (EN-RAGE) in Chronic Kidney Disease. *American Journal of Nephrology*. 2011;33(3):250-9.
285. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 25 juin 1999;97(7):889-901.
286. Hudson BI, Kalea AZ, Del Mar Arriero M, Harja E, Boulanger E, D'Agati V, et al. Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem*. 5 déc 2008;283(49):34457-68.
287. Tominaga T, Sahai E, Chardin P, McCormick F, Courtneidge SA, Alberts AS. Diaphanous-Related Formins Bridge Rho GTPase and Src Tyrosine Kinase Signaling. *Molecular Cell*. 1 janv 2000;5(1):13-25.
288. Xu Y, Toure F, Qu W, Lin L, Song F, Shen X, et al. Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling and Up-regulation of Egr-1 in Hypoxic Macrophages. *J Biol Chem*. 23 juill 2010;285(30):23233-40.
289. Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*. août 2011;11(4):244-52.
290. Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett*. 28 août 2003;550(1-3):107-13.
291. Reddy MA, Li S-L, Sahar S, Kim Y-S, Xu Z-G, Lanting L, et al. Key role of Src kinase in S100B-induced activation of the receptor for advanced glycation end products in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 12 mai 2006;281(19):13685-93.
292. Hou FF, Ren H, Owen WF, Guo ZJ, Chen PY, Schmidt AM, et al. Enhanced Expression of Receptor for Advanced Glycation End Products in Chronic Kidney Disease. *JASN*. 7 janv 2004;15(7):1889-96.
293. Isoyama N, Leurs P, Qureshi AR, Bruchfeld A, Anderstam B, Heimbürger O, et al. Plasma S100A12 and soluble receptor of advanced glycation end product levels and mortality in chronic kidney disease Stage 5 patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1 janv 2015;30(1):84-91.
294. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*. 1 avr 1994;269(13):9889-97.
295. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. mai 2001;280(5):E685-694.
296. Basta G, Lazzarini G, Del Turco S, Ratto GM, Schmidt AM, De Caterina R. At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion

- molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2005;25(7):1401-7.
297. Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation.* 19 févr 2002;105(7):816-22.
 298. Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb.* oct 1994;14(10):1521-8.
 299. Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest.* mai 1993;91(5):2155-68.
 300. Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, et al. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation.* 7 oct 1997;96(7):2262-71.
 301. Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* nov 1990;87(22):9010-4.
 302. Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H. Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest.* août 1992;90(2):439-46.
 303. Jin X, Yao T, Zhou Z, Zhu J, Zhang S, Hu W, et al. Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF- κ B Pathway. *BioMed Research International.* 2015;2015:1-12.
 304. Isoda K, Folco EJ, Shimizu K, Libby P. AGE-BSA decreases ABCG1 expression and reduces macrophage cholesterol efflux to HDL. *Atherosclerosis.* juin 2007;192(2):298-304.
 305. Higashi T, Sano H, Saishoji T, Ikeda K, Jinnouchi Y, Kanzaki T, et al. The receptor for advanced glycation end products mediates the chemotaxis of rabbit smooth muscle cells. *Diabetes.* mars 1997;46(3):463-72.
 306. Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E. Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest.* mars 1994;93(3):1172-8.
 307. Sun L, Ishida T, Yasuda T, Kojima Y, Honjo T, Yamamoto Y, et al. RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory effects and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovascular Research.* 18 nov 2008;82(2):371-81.
 308. Hofmann Bowman MA, Gawdzik J, Bukhari U, Husain AN, Toth PT, Kim G, et al. S100A12 in Vascular Smooth Muscle Accelerates Vascular Calcification in

- Apolipoprotein E-Null Mice by Activating an Osteogenic Gene Regulatory Program. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1 févr 2011;31(2):337-44.
309. Suga T, Iso T, Shimizu T, Tanaka T, Yamagishi S, Takeuchi M, et al. Activation of Receptor for Advanced Glycation End Products Induces Osteogenic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. *JAT*. 2011;18(8):670-83.
310. Ren X, Shao H, Wei Q, Sun Z, Liu N. Advanced glycation end-products enhance calcification in vascular smooth muscle cells. *Journal of International Medical Research*. 2009;37(3):847–854.
311. Wei Q, Ren X, Jiang Y, Jin H, Liu N, Li J. Advanced glycation end products accelerate rat vascular calcification through RAGE/oxidative stress. *BMC cardiovascular disorders*. 2013;13(1):13.
312. Willstätter R, Bamann E. Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukocyten. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*. 2009;180(1-3):127–143.
313. Lutgens SPM, Cleutjens KBJM, Daemen MJAP, Heeneman S. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *The FASEB Journal*. 1 oct 2007;21(12):3029-41.
314. Shi GP, Webb AC, Foster KE, Knoll JH, Lemere CA, Munger JS, et al. Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J Biol Chem*. 15 avr 1994;269(15):11530-6.
315. Lecaille F, Kaleta J, Brömme D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev*. déc 2002;102(12):4459-88.
316. Wiederanders B. The function of propeptide domains of cysteine proteinases. *Adv Exp Med Biol*. 2000;477:261-70.
317. Cygler M, Mort JS. Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie*. nov 1997;79(11):645-52.
318. Nishimura Y, Kawabata T, Kato K. Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Arch Biochem Biophys*. 15 févr 1988;261(1):64-71.
319. Maubach G, Schilling K, Rommerskirch W, Wenz I, Schultz JE, Weber E, et al. The Inhibition of Cathepsin S by its Propeptide — Specificity and Mechanism of Action. *European Journal of Biochemistry*. 1997;250(3):745-50.
320. Vasiljeva O, Dolinar M, Pungerčar JR, Turk V, Turk B. Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans. *FEBS Letters*. 2005;579(5):1285-90.
321. Brömme D, Bonneau PR, Lachance P, Wiederanders B, Kirschke H, Peters C, et al. Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification

- and characterization of the recombinant enzyme. *J Biol Chem.* 3 mai 1993;268(7):4832-8.
322. Mcgrath ME, Palmer JT, Brömme D, Somoza JR. Crystal structure of human cathepsin S. *Protein Science.* juin 1998;7(6):1294-302.
323. Hook G, Jacobsen JS, Grabstein K, Kindy M, Hook V. Cathepsin B is a New Drug Target for Traumatic Brain Injury Therapeutics: Evidence for E64d as a Promising Lead Drug Candidate. *Front Neurol.* 2015;6:178.
324. Schechter I, Berger A. On the active site of proteases. III. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 6 sept 1968;32(5):898-902.
325. Pauly TA, Sulea T, Ammirati M, Sivaraman J, Danley DE, Griffor MC, et al. Specificity Determinants of Human Cathepsin S Revealed by Crystal Structures of Complexes., *Biochemistry.* 1 mars 2003;42(11):3203-13.
326. Cstorner A, Ménard R. [33] Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. In: *Methods in Enzymology.* Academic Press; 1994
327. Kirschke H, Wiederanders B, Brömme D, Rinne A. Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J.* 1 déc 1989;264(2):467-73.
328. Beers C, Honey K, Fink S, Forbush K, Rudensky A. Differential Regulation of Cathepsin S and Cathepsin L in Interferon γ -treated Macrophages. *J Exp Med.* 20 janv 2003;197(2):169-79.
329. Hsing LC, Rudensky AY. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev.* oct 2005;207:229-41.
330. Sage J, Mallèvre F, Barbarin-Costes F, Samsonov SA, Gehrcke J-P, Pisabarro MT, et al. Binding of Chondroitin 4-Sulfate to Cathepsin S Regulates Its Enzymatic Activity. *Biochemistry.* 17 sept 2013;52(37):6487-98.
331. Shi H-T, Wang Y, Jia L-X, Qin Y-W, Liu Y, Li H-H, et al. Cathepsin S contributes to macrophage migration via degradation of elastic fibre integrity to facilitate vein graft neointimal hyperplasia. *Cardiovascular Research.* 1 mars 2014;101(3):454-63.
332. Wang Y, Baron RM, Zhu G, Joo M, Christman JW, Silverman ES, et al. PU.1 Regulates Cathepsin S Expression in Professional APCs. *The Journal of Immunology.* 1 janv 2006;176(1):275-83.
333. Nagaoka Y, Otsu K, Okada F, Sato K, Ohba Y, Kotani N, et al. Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides. *Biochem Biophys Res Commun.* 27 mai 2005;331(1):215-23.
334. Cheng XW, Obata K, Kuzuya M, Izawa H, Nakamura K, Asai E, et al. Elastolytic Cathepsin Induction/Activation System Exists in Myocardium and Is Upregulated in Hypertensive Heart Failure. *Hypertension.* 1 nov 2006

335. Sukhova GK. Cystatin C Deficiency Increases Elastic Lamina Degradation and Aortic Dilatation in Apolipoprotein E-Null Mice. *Circulation Research*. 20 janv 2005;96(3):368-75.
336. Brix K, Lemansky P, Herzog V. Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology*. mai 1996;137(5):1963-74.
337. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neill SJ, Levine RL, et al. Cathepsin B, L, and S Cleave and Inactivate Secretory Leucoprotease Inhibitor. *J Biol Chem*. 9 juill 2001;276(36):33345-52.
338. Pierre P, Mellman I. Developmental Regulation of Invariant Chain Proteolysis Controls MHC Class II Trafficking in Mouse Dendritic Cells. *Cell*. 26 juin 1998;93(7):1135-45.
339. Riese RJ, Wolf PR, Brömme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, et al. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*. avr 1996;4(4):357-66.
340. Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, et al. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*. févr 1999;10(2):197-206.
341. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol*. mai 2006;44(5):265-74.
342. Shi G.-P., Sukhova G.K., Kuzuya M., Ye Q., Du J., Zhang Y., et al. Deficiency of the Cysteine Protease Cathepsin S Impairs Microvessel Growth. *Circulation Research*. 21 mars 2003;92(5):493-500.
343. Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix Metalloproteinases: Inflammatory Regulators of Cell Behaviors in Vascular Formation and Remodeling. *Mediators Inflamm*. 2013
344. Everts V, Beertsen W, Schröder R. Effects of the proteinase inhibitors leupeptin and E-64 on osteoclastic bone resorption. *Calcif Tissue Int*. sept 1988;43(3):172-8.
345. Qin Y, Cao X, Guo J, Zhang Y, Pan L, Zhang H, et al. Deficiency of cathepsin S attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res*. 1 déc 2012;96(3):401-10.
346. Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, et al. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. janv 2011;41 Suppl 1:S1-58.
347. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*. juin 2000;105(11):1605-12.

348. Lv B-J, Lindholt JS, Cheng X, Wang J, Shi G-P. Plasma Cathepsin S and Cystatin C Levels and Risk of Abdominal Aortic Aneurysm: A Randomized Population-Based Study. *PLOS ONE*. 23 juill 2012;7(7):e41813.
349. Steubl D, Kumar SV, Tato M, Mulay SR, Larsson A, Lind L, et al. Circulating cathepsin-S levels correlate with GFR decline and sTNFR1 and sTNFR2 levels in mice and humans. *Sci Rep*. 27 févr 2017;7:43538.
350. Ahmad S, Siddiqi MI. Insights from molecular modeling into the selective inhibition of cathepsin S by its inhibitor. *J Mol Model*. 24 févr 2017;23(3):92.
351. Chung AWY, Yang HHC, Kim JM, Sigrist MK, Chum E, Gourlay WA, et al. Upregulation of matrix metalloproteinase-2 in the arterial vasculature contributes to stiffening and vasomotor dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Circulation*. 1 sept 2009;120(9):792-801.
352. Bouvet C, Moreau S, Blanchette J, de Blois D, Moreau P. Sequential activation of matrix metalloproteinase 9 and transforming growth factor beta in arterial elastocalcinosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. mai 2008;28(5):856-62.
353. Rucker RB. Calcium binding to elastin. *Adv Exp Med Biol*. 1974;48(0):185-209.
354. Hosaka N, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Kondo F, Koiwa F, et al. Elastin Degradation Accelerates Phosphate-Induced Mineralization of Vascular Smooth Muscle Cells. *Calcified Tissue International*. déc 2009;85(6):523-9.
355. Kelleher CM, McLean SE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and aortic development. *Curr Top Dev Biol*. 2004;62:153-88.
356. Rensen SSM, Doevendans PAFM, van Eys GJJM. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*. mars 2007;15(3):100-8.
357. Mackenzie NCW, Zhu D, Longley L, Patterson CS, Kommareddy S, MacRae VE. MOVAS-1 cell line: a new in vitro model of vascular calcification. *Int J Mol Med*. mai 2011;27(5):663-8.
358. Blanchevoye C, Floquet N, Scandolera A, Baud S, Maurice P, Bocquet O, et al. Interaction between the elastin peptide VGVAPG and human elastin binding protein. *J Biol Chem*. 11 janv 2013;288(2):1317-28.
359. Zhang J, Zheng B, Zhou P, Zhang R, He M, Yang Z, et al. Vascular calcification is coupled with phenotypic conversion of vascular smooth muscle cells through Klf5-mediated transactivation of the Runx2 promoter. *Bioscience Reports*. 4 nov 2014;34(6):663-72.
360. Daamen WF, Hafmans T, Veerkamp JH, Kuppevelt THV. Isolation of Intact Elastin Fibers Devoid of Microfibrils. *Tissue Engineering*. 1 juill 2005;11(7-8):1168-76.
361. Constien R, Forde A, Liliensiek B, Gröne H-J, Nawroth P, Hämmerling G, et al. Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *genesis*. 2001;30(1):36-44.

362. Hartley CJ, Reddy AK, Madala S, Entman ML, Michael LH, Taffet GE. Doppler velocity measurements from large and small arteries of mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. août 2011;301(2):H269-78.
363. Blomfield J, Farrar JF. The fluorescent properties of maturing arterial elastin. *Cardiovasc Res*. avr 1969;3(2):161-70.
364. Hata K, Koseki K, Yamaguchi K, Moriya S, Suzuki Y, Yingsakmongkon S, et al. Limited Inhibitory Effects of Oseltamivir and Zanamivir on Human Sialidases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 oct 2008;52(10):3484-91.
365. Simic-Ogrizovic S, Dopsaj V, Bogavac-Stanojevic N, Obradovic I, Stosovic M, Radovic M. Serum amyloid-A rather than C-reactive protein is a better predictor of mortality in hemodialysis patients. *Tohoku J Exp Med*. oct 2009;219(2):121-7.
366. Xie J, Burz DS, He W, Bronstein IB, Lednev I, Shekhtman A. Hexameric calgranulin C (S100A12) binds to the receptor for advanced glycated end products (RAGE) using symmetric hydrophobic target-binding patches. *J Biol Chem*. 9 févr 2007;282(6):4218-31.
367. Cai H, Song C, Endoh I, Goyette J, Jessup W, Freedman SB, et al. Serum Amyloid A Induces Monocyte Tissue Factor. *The Journal of Immunology*. 1 févr 2007;178(3):1852-60.
368. Romier B, Ivaldi C, Sartelet H, Heinz A, Schmelzer CEH, Garnotel R, et al. Production of Elastin-Derived Peptides Contributes to the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Diabetes*. 1 août 2018;67(8):1604-15.
369. Lau WL, Pai A, Moe SM, Giachelli CM. Direct Effects of Phosphate on Vascular Cell Function. *Adv Chronic Kidney Dis*. mars 2011;18(2):105-12.
370. Rodgers KJ. Destabilizing Role of Cathepsin S in Murine Atherosclerotic Plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1 avr 2006;26(4):851-6.
371. Lansing AI, Rosenthal TB, Alex M, Dempsey EW. The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *The Anatomical Record*. 1952;114(4):555-75.
372. Soskel NT, Sandburg LB. A comparison of six methods of extracting elastin residue from hamster lungs. *Exp Lung Res*. févr 1983;4(2):109-19.
373. Starcher BC, Galione MJ. Purification and comparison of elastins from different animal species. *Anal Biochem*. août 1976;74(2):441-7.
374. Krettek A, Sukhova GK, Libby P. Elastogenesis in human arterial disease: a role for macrophages in disordered elastin synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 avr 2003;23(4):582-7.
375. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebbersold R, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1

- and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res.* 7 déc 2001;89(12):1147-54.
376. Simionescu A, Simionescu DT, Vyavahare NR. Osteogenic Responses in Fibroblasts Activated by Elastin Degradation Products and Transforming Growth Factor- β 1. *The American Journal of Pathology.* juill 2007;171(1):116-23.
377. Sun Y, Byon CH, Yuan K, Chen J, Mao X, Heath JM, et al. Smooth Muscle Cell-Specific Runx2 Deficiency Inhibits Vascular Calcification. *Circulation Research.* 17 août 2012;111(5):543-52.
378. Han M, Dong L-H, Zheng B, Shi J-H, Wen J-K, Cheng Y. Smooth muscle 22 alpha maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling. *Life Sci.* 27 mars 2009;84(13-14):394-401.
379. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol.* sept 2010;7(9):528-36.
380. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney International.* 1 nov 2002;62(5):1724-31.
381. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AMJJ. HADDOCK: A Protein-Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. *J Am Chem Soc.* 19 févr 2003;125(7):1731-7.
382. van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, et al. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *Journal of Molecular Biology.* 22 févr 2016;428(4):720-5.
383. Heinz H, Lin T-J, Kishore Mishra R, Emami FS. Thermodynamically Consistent Force Fields for the Assembly of Inorganic, Organic, and Biological Nanostructures: The INTERFACE Force Field. *Langmuir.* 12 févr 2013;29(6):1754-65.
384. Lin T-J, Heinz H. Accurate Force Field Parameters and pH Resolved Surface Models for Hydroxyapatite to Understand Structure, Mechanics, Hydration, and Biological Interfaces. *J Phys Chem C.* 10 mars 2016;120(9):4975-92.
385. Dale MA, Xiong W, Carson JS, Suh MK, Karpisek AD, Meisinger TM, et al. Elastin-Derived Peptides Promote Abdominal Aortic Aneurysm Formation by Modulating M1/M2 Macrophage Polarization. *The Journal of Immunology.* 1 juin 2016;196(11):4536-43.
386. Zhang L, Wei T-T, Li Y, Li J, Fan Y, Huang F-Q, et al. Functional Metabolomics Characterizes a Key Role for N-Acetylneuraminic Acid in Coronary Artery Diseases. *Circulation.* 27 2018;137(13):1374-90.
387. O'Shea LK, Abdulkhalek S, Allison S, Neufeld RJ, Szewczuk MR. Therapeutic targeting of Neu1 sialidase with oseltamivir phosphate (Tamiflu®) disables cancer cell survival in human pancreatic cancer with acquired chemoresistance. *Onco Targets Ther.* 2014;7:117-34.

388. Duca L, Blaise S, Romier B, Laffargue M, Gayral S, El Btaouri H, et al. Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation. *Cardiovascular Research*. 1 juin 2016;110(3):298-308.
389. Edwards NC, Ferro CJ, Townend JN, Steeds RP. Aortic distensibility and arterial-ventricular coupling in early chronic kidney disease: a pattern resembling heart failure with preserved ejection fraction. *Heart*. août 2008;94(8):1038-43.
390. Townsend RR. Arterial Stiffness in CKD: A Review. *Am J Kidney Dis*. 13 juin 2018;
391. O'Rourke MF, Safar ME, Dzau V. The Cardiovascular Continuum extended: Aging effects on the aorta and microvasculature. *Vascular Medicine*. déc 2010;15(6):461-8.
392. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*. 3 juill 2007;116(1):85-97.
393. Lau WL, Linnes M, Chu EY, Foster BL, Bartley BA, Somerman MJ, et al. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. janv 2013;28(1):62-9.
394. Tanikawa T, Okada Y, Tanikawa R, Tanaka Y. Advanced Glycation End Products Induce Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells through RAGE/p38 MAPK. *Journal of Vascular Research*. 2009;46(6):572-80.
395. He H-Q, Liu Y, Zeng H, Sun X-L, Zhang L, Zhang X-L, et al. Advanced glycation endproducts regulate smooth muscle cells calcification in cultured HSMCs. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(10):12260.
396. Carlsson AC, Carrero J-J, Stenvinkel P, Bottai M, Barany P, Larsson A, et al. Endostatin, Cathepsin S, and Cathepsin L, and Their Association with Inflammatory Markers and Mortality in Patients Undergoing Hemodialysis. *Blood Purification*. 2015;39(4):259-65.
397. Mora Huertas AC, Schmelzer CEH, Luise C, Sippl W, Pietzsch M, Hoehenwarter W, et al. Degradation of tropoelastin and skin elastin by neprilysin. *Biochimie*. 1 mars 2018;146:73-8.
398. Biniossek ML, Nägler DK, Becker-Pauly C, Schilling O. Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S. *J Proteome Res*. 2 déc 2011;10(12):5363-73.
399. Johnson JL, George SJ, Newby AC, Jackson CL. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 25 oct 2005;102(43):15575-80.
400. Muiznieks LD, Weiss AS. Flexibility in the solution structure of human tropoelastin. *Biochemistry*. 10 juill 2007;46(27):8196-205.
401. Shigematsu T, Kono T, Satoh K, Yokoyama K, Yoshida T, Hosoya T, et al. Phosphate overload accelerates vascular calcium deposition in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant*. juin 2003;18 Suppl 3:iii86-89.

402. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular Calcification: The Killer of Patients with Chronic Kidney Disease. *JASN*. 7 janv 2009;20(7):1453-64.
403. Speer MY, Li X, Hiremath PG, Giachelli CM. Runx2/Cbfa1, but not loss of myocardin, is required for smooth muscle cell lineage reprogramming toward osteochondrogenesis. *J Cell Biochem*. 1 juill 2010;110(4):935-47.
404. Tanaka H, Miyajima K, Nakagaki M, Shimabayashi S. Interactions of Aspartic Acid, Alanine and Lysine with Hydroxyapatite. *Chem Pharm Bull*. 25 nov 1989;37(11):2897-901.
405. Rucker RB, Ford D, Riemann WG, Tom K. Additional evidence for the binding of calcium ions to elastin at neutral sites. *Calc Tis Res*. 1 déc 1974;14(1):317-25.
406. Urry DW. Neutral sites for calcium ion binding to elastin and collagen: a charge neutralization theory for calcification and its relationship to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. avr 1971;68(4):810-4.
407. Crouthamel MH, Lau WL, Leaf EM, Chavkin N, Wallingford MC, Peterson DF, et al. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: Redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. nov 2013;33(11):2625-32.
408. Li X, Giachelli C. Sodium-dependent phosphate cotransporters and vascular calcification. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 1 juill 2007;16(4):325-8.
409. Hinek A, Bodnaruk TD, Bunda S, Wang Y, Liu K. Neuraminidase-1, a subunit of the cell surface elastin receptor, desialylates and functionally inactivates adjacent receptors interacting with the mitogenic growth factors PDGF-BB and IGF-2. *Am J Pathol*. oct 2008;173(4):1042-56.
410. Gonzalez M, Martinez R, Amador C, Michea L. Regulation of the Sodium-Phosphate Cotransporter Pit-1 and its Role in Vascular Calcification. 2009
411. Song X, Yu H, Chen X, Lasanajak Y, Tappert MM, Air GM, et al. A Sialylated Glycan Microarray Reveals Novel Interactions of Modified Sialic Acids with Proteins and Viruses. *J Biol Chem*. 9 sept 2011;286(36):31610-22.
412. Thompson R, Creavin A, O'Connell M, O'Connor B, Clarke P. Optimization of the enzyme-linked lectin assay for enhanced glycoprotein and glycoconjugate analysis. *Analytical Biochemistry*. 15 juin 2011;413(2):114-22.
413. Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003;88(3):446-54.
414. Bro S. Chronic Renal Failure Accelerates Atherogenesis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1 oct 2003;14(10):2466-74.

415. Raggi P, Bellasi A, Ferramosca E, Islam T, Muntner P, Block GA. Association of pulse wave velocity with vascular and valvular calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int.* avr 2007;71(8):802-7.
416. Gauthier-Bastien A, Ung R-V, Larivière R, Mac-Way F, Lebel M, Agharazii M. Vascular remodeling and media calcification increases arterial stiffness in chronic kidney disease. *Clinical and Experimental Hypertension.* 1 mai 2014;36(3):173-80.
417. Ng K, Hildreth CM, Phillips JK, Avolio AP. Aortic stiffness is associated with vascular calcification and remodeling in a chronic kidney disease rat model. *Am J Physiol Renal Physiol.* juin 2011;300(6):F1431-1436.
418. Rezvani-Sharif A, Tafazzoli-Shadpour M, Avolio A. Mechanical Characterization of the Lamellar Structure of Human Abdominal Aorta in the Development of Atherosclerosis: An Atomic Force Microscopy Study. *Cardiovasc Eng Tech.* 13 juill 2018
419. Markl M, Schnell S, Wu C, Bollache E, Jarvis K, Barker AJ, et al. Advanced flow MRI: emerging techniques and applications. *Clin Radiol.* août 2016;71(8):779-95.
420. Salerno M, Kramer CM. Advances in cardiovascular MRI for diagnostics: applications in coronary artery disease and cardiomyopathies. *Expert Opinion on Medical Diagnostics.* 1 nov 2009;3(6):673-87.
421. Jayanth P, Amith SR, Gee K, Szewczuk MR. Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk is essential for neurotrophin activation of Trk receptors and cellular signaling. *Cellular Signalling.* 1 août 2010;22(8):1193-205.
422. Kaya B, Paydas S, Aikimbaev K, Altun E, Balal M, Deniz A, et al. Prevalence of cardiac arrhythmia and risk factors in chronic kidney disease patients. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation.* 5 janv 2018;29(3):567.
423. Järhult JD. Oseltamivir (Tamiflu®) in the environment, resistance development in influenza A viruses of dabbling ducks and the risk of transmission of an oseltamivir-resistant virus to humans – a review. *Infect Ecol Epidemiol.*
424. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, et al. Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy. *Kidney Int.* janv 1995;47(1):186-92.
425. London GM. Cardiovascular disease in chronic renal failure: pathophysiologic aspects. *Semin Dial.* avr 2003;16(2):85-94.

Implication de l'axe RAGE / Cathepsine S / Peptides d'élastine dans la survenues des calcifications vasculaires au cours de l'insuffisance rénale chronique.

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est un problème de santé touchant 10 à 15% de la population mondiale. Les principales causes de décès associées sont les complications cardiovasculaires, principalement les calcifications, et il est nécessaire de proposer de manière urgente de nouvelles thérapies. Nous avons montré un rôle pour le récepteur aux produits de glycation avancés (RAGE) dans le processus de calcification. Plusieurs études ont de plus suggéré l'implication de la Cathepsine S (CathS) dans l'élastolyse et les calcifications vasculaires associées à la néphropathie. Cependant, le lien entre ces différents acteurs et leur implication dans les calcifications vasculaires restait inconnu.

Nous avons utilisé des modèles de souris IRC ApoE^{-/-} ou ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} (DKO). L'induction de l'IRC augmente les calcifications, l'expression de CathS et l'élastolyse de manière dépendante de RAGE. Nous avons montré par microscopie électronique à balayage et spectrométrie de masse que la CathS dégrade l'élastine insoluble et produit des peptides d'élastine (PE) bioactifs. Ces derniers participent aux processus de calcification *in vitro* des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) potentialisant l'effet du phosphate inorganique. Le complexe récepteur de l'élastine (CRE) est impliqué et les effets pro-calcifiants des PE étudiés ont été confirmés *ex vivo* et *in vivo*. Ces peptides participent à une boucle d'amplification en déclenchant l'expression de CathS et le ciblage *in vivo* du CRE avec du Tamiflu® conduit à une amélioration des complications associées à la calcification, la rigidité vasculaire et l'arythmie cardiaque.

RAGE, Cathepsine S, calcifications vasculaires, peptides d'élastine, insuffisance rénale chronique

Involvement of RAGE / Cathepsin S / Elastin peptides axis in vascular calcifications during chronic kidney disease

Chronic Kidney Disease (CKD) is a major health problem affecting 10% to 15% of worldwide population. The main-associated causes of death are cardiovascular complications, mainly represented by vascular calcifications for which it is necessary to urgently propose new therapeutics. We recently reported a role for the Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE) in the uremic vascular calcification process following engagement by uremic toxins. Interestingly, several studies suggested the involvement of Cathepsin S (CathS) in CKD-associated elastolysis and vascular calcifications. However, the link between these different actors and their involvement in vascular calcifications remained unknown. We used a mice model of CKD in ApoE^{-/-} or ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} (DKO) backgrounds. We found that induction of CKD increased the calcification process, CathS expression and elastolysis in a RAGE-dependent manner. We showed by electron microscopy scanning and mass spectrometry that CathS degrades insoluble elastin producing bioactive elastin-derived peptides (EDPs). The latter trigger *in vitro* calcification process of vascular smooth muscle cells (VSMCs) by potentiating inorganic phosphate effect. The elastin receptor complex (ERC) is involved and results about pro-calcifying effects of CathS-derived EDPs were confirmed *ex vivo* and *in vivo*. CathS-derived EDPs participated in an amplification loop by triggering CathS expression and the *in vivo* targeting of ERC with Tamiflu® leads to an improvement of calcification-associated complications, *i.e.* vascular stiffness and cardiac arrhythmias.

RAGE, Cathepsine S, elastin derived peptides, vascular calcifications, chronic kidney disease