



THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Biologie des organismes

« Bases moléculaires de l'hétérogénéité des calcifications athéromateuses et de
l'hétérogénéité des artères périphériques »

Thèse présentée et soutenue à Nantes le 28/09/2018

Unité de recherche : UMR 1238

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Pr Alessandra Bura-Rivière, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CHU Toulouse.

Pr Philippe Lacroix, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CHU Limoges.

Composition du Jury :

Président : **Pr Philippe Lacroix**, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CHU Limoges.

Examineur : **Pr Alessandra Bura-Rivière**, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CHU Toulouse.

Dir. de thèse : **Pr Yann Gouëffic**, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CHU Nantes.

Co-dir. de thèse : **Dr Thibaut Quillard**, INSERM 1238, Laboratoire Phy-Os, Université de Nantes

Titre : Bases moléculaires de l'hétérogénéité des calcifications athéromateuses et de l'hétérogénéité des artères périphériques

Mots clés : Calcifications artérielles, artères fémorales, artères carotides, athérosclérose, hétérogénéité artérielle, transforming growth factor.

Les calcifications artérielles sont fréquemment rencontrées au cours des maladies artérielles périphériques qui comprennent les atteintes athérosclérotiques. Les calcifications artérielles sont un marqueur indépendant de morbidité cardiovasculaire et impactent fortement les réponses thérapeutiques. Leur formation est issue de multiples processus dont certains sont proches de l'ossification. A partir de deux biocollections de patients, nous avons identifié quatre sous-types de calcifications intimaux aux niveaux des artères athérosclérotiques carotidiennes, fémorales et infra-poplitées. Nous avons montré que les artères fémorales sont globalement plus calcifiées que les autres territoires, avec une présence beaucoup plus fréquente de métaplasie ostéoïde (structure osseuse), alors que les microcalcifications sont préférentiellement retrouvées au niveau carotidien. Les facteurs de risque cardiovasculaires, n'influencent pas les sous-types de calcifications, qui sont par contre fortement associés aux territoires. L'analyse de l'expression différentielle des gènes et miARNs au sein de la paroi artérielle permet de ségréger les échantillons en fonctions de leur origine anatomique (carotidienne, fémorale ou infra-poplitée). Ces différences d'expression se retrouvent entre les territoires des artères saines comme celles atteintes d'athérosclérose. Dans les artères pathologiques, on retrouve les clusters de gènes associés aux différences de composition de plaques qui s'y développent. De manière intéressante, on retrouve également des gènes différentiellement exprimés entre artères saines, eux aussi associés à ces types de plaques. Ces résultats suggèrent une prédisposition vasculaire pour développer tel ou tel type de plaque, avec pour les artères fémorales une prédisposition particulière pour l'ossification. Cette hypothèse est renforcée les résultats in vitro montrant une susceptibilité de minéralisation plus importante des cellules musculaires lisses (CML) d'artères fémorales saines par rapport à d'autres territoires. De façon particulière, la voie du Transforming Growth factor (TGF) est surexprimée au niveau des artères fémorales. Nous avons montré que son récepteur TGF β R1 était impliqué dans les différences de minéralisation entre CML fémorales et carotidiennes.

Les calcifications artérielles sont fréquemment rencontrées au cours des maladies artérielles périphériques qui comprennent les atteintes athérosclérotiques. Les calcifications artérielles sont un marqueur indépendant de morbidité cardiovasculaire et impactent fortement les réponses thérapeutiques. Leur formation est issue de multiples processus dont certains sont proches de l'ossification. A partir de deux biocollections de patients, nous avons identifié quatre sous-types de calcifications intimaux aux niveaux des artères athérosclérotiques carotidiennes, fémorales et infra-poplitées. Nous avons montré que les artères fémorales sont globalement plus calcifiées que les autres territoires, avec une présence beaucoup plus fréquente de métaplasie ostéoïde (structure osseuse), alors que les microcalcifications sont préférentiellement retrouvées au niveau carotidien. Les facteurs de risque cardiovasculaires, n'influencent pas les sous-types de calcifications, qui sont par contre fortement associés aux territoires. L'analyse de l'expression différentielle des gènes et miARNs au sein de la paroi artérielle permet de ségréger les échantillons en fonctions de leur origine anatomique (carotidienne, fémorale ou infra-poplitée). Ces différences d'expression se retrouvent entre les territoires des artères saines comme celles atteintes d'athérosclérose. Dans les artères pathologiques, on retrouve les clusters de gènes associés aux différences de composition de plaques qui s'y développent. De manière intéressante, on retrouve également des gènes différentiellement exprimés entre artères saines, eux aussi associés à ces types de plaques. Ces résultats suggèrent une prédisposition vasculaire pour développer tel ou tel type de plaque, avec pour les artères fémorales une prédisposition particulière pour l'ossification. Cette hypothèse est renforcée les résultats in vitro montrant une susceptibilité de minéralisation plus importante des cellules musculaires lisses (CML) d'artères fémorales saines par rapport à d'autres territoires. De façon particulière, la voie du Transforming Growth factor (TGF) est surexprimée au niveau des artères fémorales. Nous avons montré que son récepteur TGF β R1 était impliqué dans les différences de minéralisation entre CML fémorales et carotidiennes.

Title: Molecular basis of atherosclerotic calcification heterogeneity and heterogeneity of peripheral arteries

Keywords : Arterial calcifications, femoral arteries, carotid arteries, atherosclerosis, arterial heterogeneity, transforming growth factor.

Arterial calcifications are frequently encountered in peripheral arterial diseases that include atherosclerotic disease. Arterial calcifications are an independent marker of cardiovascular morbidity and strongly impact therapeutic responses. Their formation is the result of multiple processes, some of which are close to ossification. From two patients' biocollections, we identified four subtypes of intimal calcifications in carotid, femoral and infra-popliteal atherosclerotic arteries. We have shown that the femoral arteries are globally more calcified than the other territories, with much more frequent presence of osteoid metaplasia (bone structure), whereas the microcalcifications are preferentially found at the carotid level. Cardiovascular risk factors do not influence the subtypes of calcification, but are strongly associated with the territories. The analysis of the differential expression of genes and miRNAs of the arterial wall makes it possible to segregate the samples according to their anatomical origin (carotid, femoral or infra-popliteal). These differences of expression are found between the territories in healthy and atherosclerosis arteries. In pathological arteries, there are clusters of genes associated with differences in plaque composition that develop there. Interestingly, there are also genes differentially expressed between healthy arteries, also associated with plaques. These results suggest a vascular predisposition to develop such or such type of plaque, with for the femoral arteries a special predisposition for ossification. This hypothesis is reinforced by in vitro results showing greater susceptibility to mineralization of smooth muscle cells (SMCs) of healthy femoral arteries compared to other territories. In particular, the Transforming Growth Factor (TGF) pathway is overexpressed at the level of the femoral arteries. We showed that its TGF β R1 receptor was involved in mineralization differences between femoral and carotid SMCs.

Arterial calcifications are frequently encountered in peripheral arterial diseases that include atherosclerotic disease. Arterial calcifications are an independent marker of cardiovascular morbidity and strongly impact therapeutic responses. Their formation is the result of multiple processes, some of which are close to ossification. From two patients' biocollections, we identified four subtypes of intimal calcifications in carotid, femoral and infra-popliteal atherosclerotic arteries. We have shown that the femoral arteries are globally more calcified than the other territories, with much more frequent presence of osteoid metaplasia (bone structure), whereas the microcalcifications are preferentially found at the carotid level. Cardiovascular risk factors do not influence the subtypes of calcification, but are strongly associated with the territories. The analysis of the differential expression of genes and miRNAs of the arterial wall makes it possible to segregate the samples according to their anatomical origin (carotid, femoral or infra-popliteal). These differences of expression are found between the territories in healthy and atherosclerosis arteries. In pathological arteries, there are clusters of genes associated with differences in plaque composition that develop there. Interestingly, there are also genes differentially expressed between healthy arteries, also associated with plaques. These results suggest a vascular predisposition to develop such or such type of plaque, with for the femoral arteries a special predisposition for ossification. This hypothesis is reinforced by in vitro results showing greater susceptibility to mineralization of smooth muscle cells (SMCs) of healthy femoral arteries compared to other territories. In particular, the Transforming Growth Factor (TGF) pathway is overexpressed at the level of the femoral arteries. We showed that its TGF β R1 receptor was involved in mineralization differences between femoral and carotid SMCs.

Table des matières

1. Introduction	9
1.1 Anatomie artérielle	9
1.1.1 Structure de la paroi artérielle	10
1.1.2 Vascularisation de la paroi artérielle	11
1.1.3 Classification artérielle en fonction de leur calibre et de leur structure	11
1.2 L'athérosclérose	15
1.2.1 Facteurs génétiques	17
1.2.2 Rôle des infections au cours athérosclérose	18
1.2.3 Différentes phases de l'initiation et progression athéromateuse	18
1.2.4 Classification anatomopathologique de l'athérosclérose humaine	33
1.3 Calcifications artérielles	38
1.3.1 Aspects histologiques des calcifications artérielles	38
1.3.2 Calcifications artérielles et risque cardiovasculaire	45
1.3.3 Aspects histologiques des calcifications intimaux (ou athérosclérotiques)	46
1.3.5 Mécanismes de calcification et d'ostéogenèse dans l'athérosclérose.....	49
1.4 Epigénétique et micro-ARN	70
1.4.1 Micro-ARN	70
1.4.2 Micro-ARN et pathologies artérielles périphériques	72
1.4.3 Micro-ARN et ossification	73
1.5 Concept de l'hétérogénéité artérielle et hétérogénéité des PAD	77
2. Implication des cellules musculaires lisses dans les calcifications artérielles en fonction du territoire avec évaluation de l'effet du TGF β sur le processus de calcification	79
3. Impact des Facteurs de risque cardiovasculaire sur les calcifications et différences génomiques entre artères athérosclérotiques et artères saines issues de différents territoires périphériques	98
4. Etude des Micro RNA dans les processus des calcifications artérielles périphériques	112
4.1 Matériel et méthodes	112
4.2 Résultats	113
5. Discussion	119
5.1 Les processus de calcification artériel sont complexes avec des mécanismes communs mais également des différences particulières en fonctions des territoires qui restent à élucider	119
5.2 Différents types de plaques et différents types de calcifications	122
5.4 Elements apportés par ce travail.....	127
5.3 Perspectives	127
6. Bibliographie	128

Remerciements :

L'ensemble de ses travaux n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien de très nombreuses personnes. Ainsi, je tenais particulièrement à remercier :

Philippe Lacroix et **Alessandra Bura-Rivière** qui me font l'honneur de juger ce travail,

Yann Gouëffic et **Thibaut Quillard** pour m'avoir encadré un tout au long de cette thèse, et fait part de leur vision de la recherche tant clinique que fondamentale,

Françoise Redini pour m'avoir accueillie dans son laboratoire au cours de ces années de thèse,

Mathias Chatelais pour ton aide, l'ensemble des plaisanteries et tes récits de marin d'eau douce,

Marc-Antoine Pistorius pour son soutien sans cesse renouvelé,

Marja Steenman pour ta disponibilité et l'explication sur les clusters,

Benjamin Navet pour les conseils lors des Manip,

Béatrice Delasalle pour ton aide et tes explications statistiques,

Céline Charrier et **Séverine Battaglia** que je remercie pour toutes leurs explications et pour les nombreuses fois où elles m'ont assuré d'une tranquillité vespérale « à double tour » à mon insu,

Valérie Trichet pour sa bonne humeur et le partage de son radiateur pendant les mois d'hiver,

Luciano Vidal pour ses idées, sa culture de la viande Argentine et de nombreuses discussions sur les facteurs de risque cardiovasculaire,

Je tiens remercier toute l'équipe du laboratoire « Phy Os » avec laquelle j'ai beaucoup aimé travailler dans une ambiance à la fois studieuse et sympathique,

Je remercie également toute l'équipe de médecine vasculaire du CHU de Nantes qui a également contribué, dans une certaine mesure, à l'accomplissement de ses travaux.

Et enfin, je remercie **Alexandra, Marine, Gabriel** et **Thibaud** qui ont vécu au quotidien ses années de thèse.

Abréviations :

AOMI : artérite oblitérante des membres inférieurs

BMP : bone morphogenic protéine

CE : Cellule endothéliale

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CML : Cellule musculaire lisse

CML vasculaire : Cellules musculaires lisses vasculaires

ECLA : Etude comparative des lésions athéromateuses

ESS : Stress de cisaillement endothélial

GWAS: genome-wide association study

Il-6 : interleukine 6

LEI : Limitante élastique interne

MEC : Matrice extra-cellulaire

MGP : Matrix Gamma-Carboxyglutamate (gla) Protein

OPG: ostéoprotégérine

SNP: single nucleotid polymorphism

TGFβ: Transforming growth factor β

TNAP : phosphatase alcaline non spécifique tissulaire

TNF : Tumor Necrosis Factor

Préambule et objectifs de la recherche

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet d'étude des calcifications des artères périphériques. Ces calcifications qui sont rencontrées tout au long de l'arbre artériel, impactent la stabilité des plaques d'athérome, augmentent la rigidité de la paroi artérielle et modifient le comportement pariétal vis-à-vis de l'implantation de matériel étranger comme les stents ; elles apportent également une variabilité dans la réponse aux angioplasties. Ce projet a été initié par des constatations cliniques réalisées par les médecins et les chirurgiens vasculaires : les calcifications des artères carotidiennes et fémorales sont distinctes d'un point de vue échographique comme lors des constatations en peropératoire.

Ainsi à partir de deux biocollections : Étude comparative des lésions artérielles (ECLA) et l'étude comparative des lésions artérielles et génomique (ECLAGEN) qui sont des biocollections d'échantillons artériels humains de plaques d'athérome et d'artères saines, de plasmas, de données cliniques issues de patients opérés pour une artériopathie athéromateuse mais également pour ECLAGEN, du matériel génomique avec possibilité de réaliser des études d'expression des ARN issus des tissus artériels périphériques.

L'objectif de cette étude est d'apporter des éléments descriptifs et mécanistiques des calcifications des artères périphériques avec une approche comparative. Un premier résultat de nos recherches a été de mettre en évidence les différences qualitatives et quantitatives en termes de calcification des lésions athéromateuses en fonction des territoires artériels, avec la démonstration que les lésions artérielles fémorales et infra-poplitées sont plus fibrotiques et plus largement calcifiées que les lésions carotidiennes qui sont quant à elles beaucoup plus riches en lipides et avec des calcifications souvent plus diffuses. Les calcifications des artères fémorales se présentent plus fréquemment sous la forme de tissu osseux ectopique dénommée métaplasie ostéoïde, alors que les plaques carotidiennes développent notamment des microcalcifications plus ou moins aggrégées à proximité des cristaux de cholestérol.

Les processus qui concourent à ces calcifications sont mal connus. De longue date, les calcifications artérielles étaient imputées à un processus passif de précipitation phosphocalcique résultant du vieillissement de la plaque d'athérome. Au cours des dernières décennies, de nombreux travaux ont mis en évidence qu'il s'agissait d'un phénomène actif faisant intervenir des processus que l'on rencontre typiquement lors de l'ossification physiologique.

L'objectif de cette recherche est d'identifier des acteurs géniques et post-transcriptomiques d'intérêt (gènes et microARNs) intervenant dans ces processus de calcification des artères périphériques.

L'introduction de ce travail rappellera les différents éléments physiologiques et cliniques permettant une meilleure compréhension des processus intervenant dans les calcifications des artères périphériques, et exposera nos hypothèses de travail. Les résultats, illustrés par mes 2 publications [1,2], montreront cette hétérogénéité de plaques et de calcification entre territoires, et l'impact d'une voie de signalisation particulière, celle du TGF β dans la susceptibilité exacerbée de minéralisation des artères fémorales. La deuxième partie de mon travail présentera les différentes voies moléculaires et épigénétiques intervenant de façon différentielle dans les calcifications des artères périphériques.

1. Introduction

La notion de calcification caractérise la présence de cristaux de calcium déposés en grande quantité dans un tissu, ce processus est complexe et régulé, avec la présence d'une minéralisation des tissus en présence d'une matrice extra cellulaire (MEC) particulière et le recrutement, la différenciation de cellules spécifiques de la lignée osseuse. Les mécanismes qui sous-tendent ces calcifications sont nombreux avec une composante de dépôt minéral passif dans les vaisseaux mais également de nombreux mécanismes hautement régulés. On peut également observer des structures calcifiées beaucoup plus complexes puisqu'elles répondent à une composition proche de l'os. Il s'agit alors d'ossification ectopique. Ce processus est hautement régulé et fait intervenir de nombreuses voies moléculaires comme de nombreux acteurs cellulaires similaires au compartiment osseux.

Au cours de l'athérosclérose, ces processus de calcification et d'ossification de la paroi artérielle sont observés, mais encore mal caractérisés. Nous avons souhaité décrire les différences en termes de calcifications et d'ossification que l'on peut observer chez les patients présentant une athérosclérose et identifier les molécules à l'origine de ces processus.

1.1 Anatomie artérielle

Le réseau artériel a pour principal objectif de réguler la pression artérielle et d'irriguer efficacement les différents organes, apportant les différents éléments métaboliques nécessaires à leurs fonctions physiologiques. Le calibre des artères décroît de l'aorte jusqu'aux artérioles. La composition de la paroi évolue également en fonction du calibre de l'artère. Cependant, tout au long de l'arbre artériel, on retrouve une composition histologique similaire en matière de structures et types cellulaires (fibres élastiques, cellules musculaires lisses (CML), cellules endothéliales (CE), tissu conjonctif et fibroblastes) qui évoluent tout au long de l'arbre artériel et qui vise à s'adapter au régime de pression observé dans chacun des territoires [3–5].

1.1.1 Structure de la paroi artérielle

La paroi des artères comporte schématiquement trois tuniques concentriques (Figure 1) :

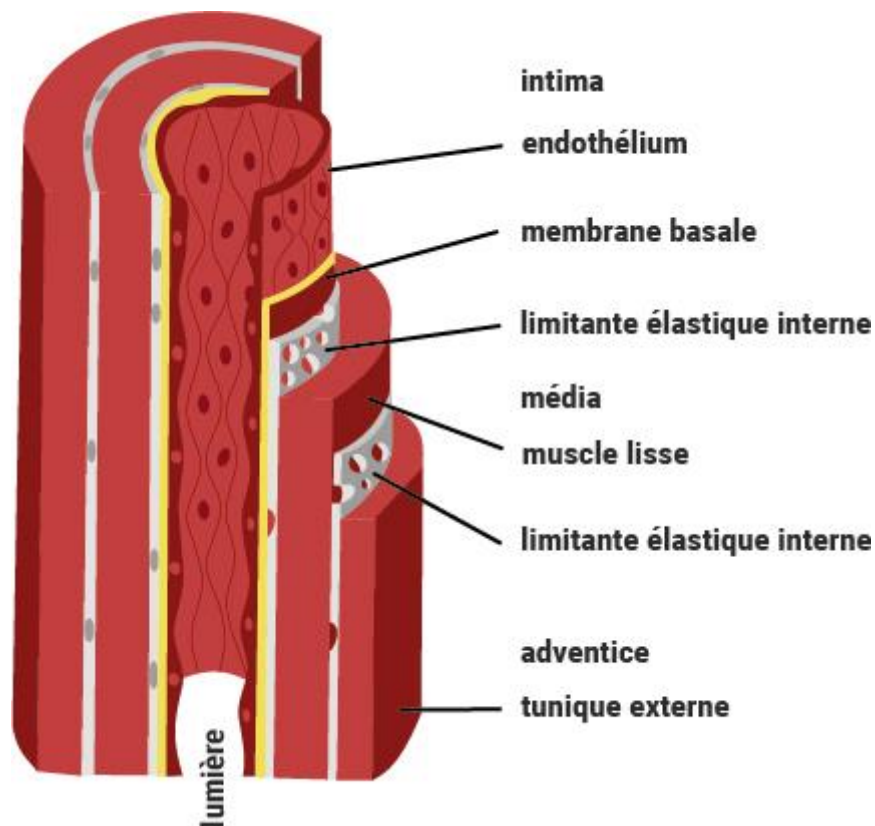


Figure 1 : Anatomie artérielle.

- L'intima est la tunique la plus interne, elle est au contact de la lumière, elle est constituée par des cellules endothéliales qui reposent sur une membrane basale.
- La média est principalement constituée de cellules musculaires lisses, de fibres élastiques et d'une matrice extracellulaire.
- L'adventice est la tunique la plus périphérique, composée de tissu conjonctif.

Ces différentes tuniques sont facilement identifiables lors des analyses histologiques. En clinique la distinction entre ces tuniques est plus complexe. Avec les technologies actuelles, il est quasiment impossible de distinguer les trois tuniques en échographie. Cependant, il est possible d'apprécier l'épaisseur intima/média de façon standardisée. Cette épaisseur intima/média est affectée par les facteurs de risque cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, la dyslipidémie, le tabagisme, le diabète, l'âge et le sexe [6].

1.1.2 Vascularisation de la paroi artérielle

Pour mener à bien leur fonction, les artères d'un calibre de plus d'1mm ont une vascularisation propre à des fins « nourricière » par l'intermédiaire de vasa vasorum. Les vasa vasorum sont issus de petites artères cheminant le long des artères principales à desservir qui se distribuent au niveau de l'adventice et dans les deux tiers externes de la média au niveau de l'aorte ; l'intima et le tiers interne de la média sont nourris depuis la lumière artérielle [7].

1.1.3 Classification artérielle en fonction de leur calibre et de leur structure

Artères élastiques

Les artères élastiques comprenant les vaisseaux de grand calibre, regroupent l'aorte, le tronc artériel brachiocéphalique, l'artère sous-clavière, l'artère rénale ainsi que l'artère thoracique interne. Il s'agit d'artères de conduction qui conservent la pression artérielle du fait d'une structure particulière. Leur intima est plus épaisse que pour les autres types d'artères, et elle repose sur une lame basale avec une couche de tissu conjonctif sous endothélial. Les cellules endothéliales sont aplaties et jointives avec des jonctions serrées et des jonctions communicantes qui ont un rôle mécanique. Le sous endothélium est constitué de collagène et de microfibres. Il est élastique constitué de protéoglycannes et de quelques CML avec un phénotype particulier de type myointimale. La limitante élastique interne (LEI) constitue la limite avec la média, elle est souvent difficile à individualiser ; la média très épaisse par rapport aux autres types artériels comporte plusieurs dizaines de couches de CML concentriques à orientation hélicoïdale (70 à 80 couches au niveau de l'aorte thoracique), l'orientation en pas de vis alternant d'une lame élastique à l'autre. Dans la média, on retrouve principalement des CML associées aux fibres élastiques et aux fibres de collagène. L'adventice est plus mince que les autres tuniques [7]. Riche en collagène, elle porte l'innervation et les vasa vasorum qui pénètrent jusqu'à la partie externe de la média (Figure 2).

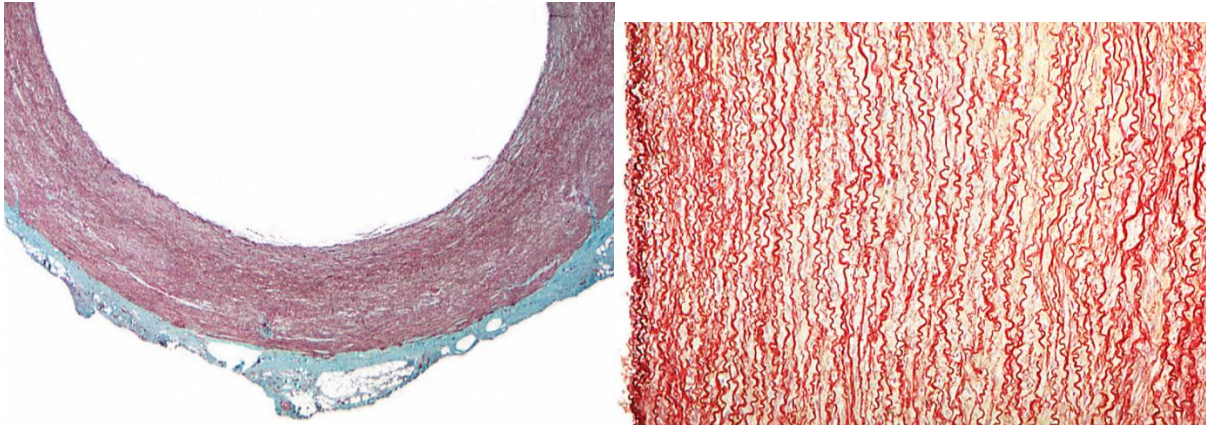


Figure 2 : Coupe transversale d'artère élastique d'aorte (A), lame élastique au niveau de la paroi aortique (B).

Artères musculaires

Elles sont constituées d'artères de moyen calibre issues des divisions des artères élastiques, elles regroupent les artères des membres et les artères viscérales : les artères cérébrales, coronaires, radiales, fémorales, tibiales. Elles remplissent également un rôle de distribution du sang. Leur intima est fine, le sous endothélium est très mince ; elle est constituée de glycosaminoglycanes et de quelques fibrillations élastiques et collagéniques. La LEI s'individualise plus facilement que pour les artères élastiques. Elle est fenêtrée, permettant des échanges cellulaires et moléculaires entre l'intima et la média. L'épaisseur de la média est variable en fonction du calibre artériel, elle est comprise entre une LEI et une limitante élastique externe (LEE) moins épaisse. La média est constituée de CML d'orientation circulaire avec un phénotype contractile limitée par des fibres de collagène et des fibres élastiques. Les CML ont un aspect fusiforme de 25 à 50 μm de long et sont entourées d'une lame basale connectée avec la matrice interstitielle par l'intermédiaire de protéines membranaires assurant des jonctions cellules maîtrisées. Les CML sont également connectées entre elles par des jonctions intercellulaires de type macula adherens, hémidesmosomes et jonction communicante. Il existe en moyenne une dizaine de couches de CML au niveau de la média des artères musculaires de petit calibre[7]. L'adventice est épaisse et constituée de faisceaux de fibres de collagène associée à des fibres élastiques (Figure 3). Les artères cérébrales ont une particularité puisqu'elles ne comportent qu'une seule lame élastique.

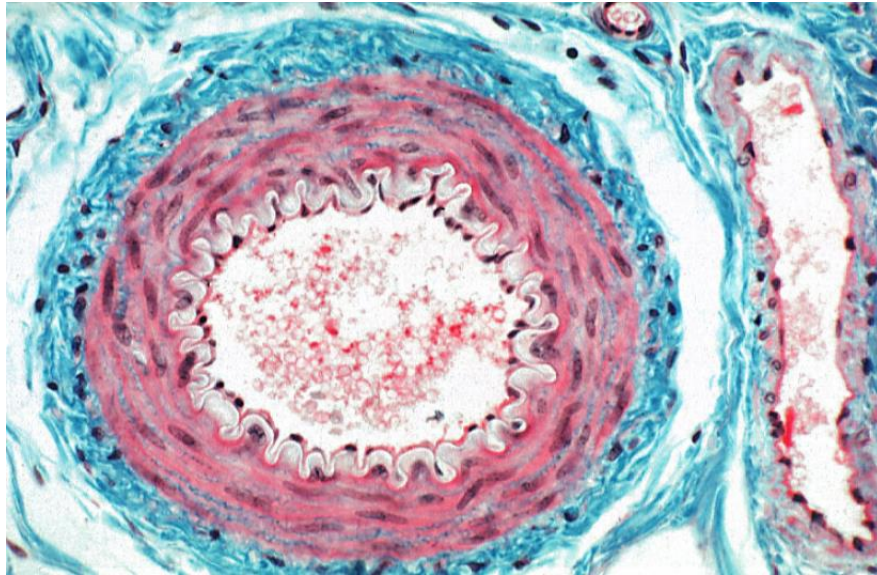


Figure 3 : Coupe transversale d'artère musculaire.

Artérioles

Il s'agit de la distalité du réseau artériel. Ce sont des branches terminales qui se terminent sur les capillaires. Elles sont de petit calibre (diamètre $< 0,3$ mm), avec une structure distincte des autres artères. Leur intima est très réduite avec simplement un endothélium reposant sur une lame basale. La composition de la média dépend de leur calibre : pour les artérioles de $0,3$ mm à $50\text{ }\mu\text{m}$, présence d'une LEI est de 2 à 3 couches de CML ; pour les artérioles de moins de $50\text{ }\mu\text{m}$, absence de LEI et présence d'une seule couche de CML de disposition circulaire. L'adventice est fine, constituée de fibres de collagène et parfois de fibres élastiques qui fusionnent avec le tissu conjonctif périartériel (Figure 4).

Les artérioles ont un rôle distinct des autres artères, faisant intervenir la notion de vasomotion avec une régulation du flux capillaire qui participe aux résistances artérielles périphériques permettant la modulation de la pression artérielle. Elles interviennent également dans la thermorégulation de l'organisme en régulant les shunts capillaire [7].

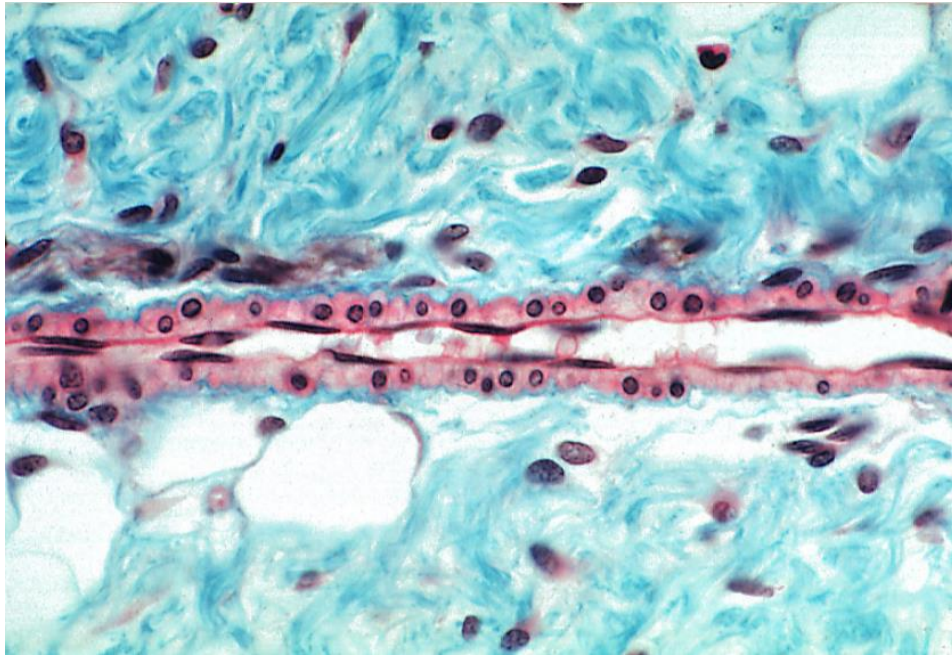


Figure 4 : Coupe longitudinale d'artériole.

Capillaires et péricytes

Les capillaires sont de fins canaux qui réalisent la transition entre le système artériel et le système veineux, ils ont un diamètre compris entre 5 et 20 μm s, ils se trouvent dans la totalité des tissus (Figure 5). Ils regroupent un système précapillaire avec une artériole précapillaire, le capillaire, et une veinule post-capillaire. Il existe une variabilité de la morphologie des capillaires suivant les territoires, ces vaisseaux pouvant adopter un aspect fenêtré, discontinu ou continu. Les échanges métaboliques se réalisent au niveau de l'anse capillaire. Le capillaire est composé d'une couche conjonctive la plus externe, d'une couche endothéliale, médiane, et d'un ciment qui participe à l'absorption au niveau de sa face interne. Au niveau du capillaire se déroule les échanges en nutriments et en oxygène. La perfusion des capillaires est régulée par le système nerveux et par l'environnement notamment cellulaire avec les péricytes. Les péricytes sont comme les CML, des cellules d'origine mésenchymateuses qui enveloppent partiellement les cellules endothéliales des capillaires et des veinules ; ils peuvent s'intégrer à la membrane basale et ils communiquent avec les cellules endothéliales par des contacts directs ou par une signalisation paracrine. Les péricytes participent à l'angiogenèse et ils pourraient avoir un rôle dans la régulation du débit sanguin par un mécanisme de vasoconstriction. On les observe également au niveau des néovaisseaux dans les plaques athéromateuses [7].



Figure 5 : Capillaire à proximité de fibre musculaire.

1.2 L'athérosclérose

La pathologie artérielle périphérique est dominée par la pathologie de l'athérosclérose. Étymologiquement, l'athérosclérose provient du grec *athere* (bouillie) et *scleros* (dur). De longue date, l'athérosclérose est décrite initialement comme une maladie associée aux lipides avec en particulier une dérégulation du cholestérol [8] puis une maladie avec une composante inflammatoire [9,10]. L'athérosclérose est une association variable, de remaniement de l'intima des artères de gros et de moyen calibre, avec une accumulation focale de lipides, de cellules, de glucides complexes, de produit dérivé du sang, de tissus fibreux et de dépôts calciques. L'athérosclérose est la cause la plus fréquente d'accidents ischémiques cardiaques ou cérébraux, elle est responsable de près de 16,1% des décès à travers le monde [11]. Il s'agit d'une maladie lente et progressive où l'on observe une inflammation pariétale chronique et la formation de plaques au niveau des artères de grand est de moyen calibre. L'évolution est asymptomatique au cours des premières décennies de son développement (athérome infraclinique) jusqu'à ce que surviennent une rupture ou une érosion des plaques entraînant la formation d'un thrombus qui obstrue par sténose la lumière du vaisseau et induit des lésions tissulaires ischémiques (Figure 6).

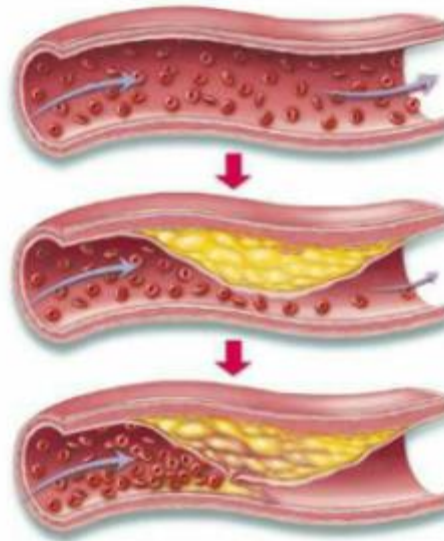


Figure 6 : Progression de la plaque d'athérome.

Dans l'athérosclérose, on observe une dysfonction endothéliale en particulier au niveau des bifurcations artérielles, là où le flux sanguin est le plus perturbé, avec des forces de cisaillement les plus faibles (Figure 7). Cette perturbation du flux est directement associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire, favorisant le dépôt et l'infiltration des particules LDL de cholestérol dans la partie sous endothéliale de l'intima [12–14]. Cette infiltration, suivie de l'oxydation de ces particules lipidiques, déclenche une inflammation locale avec un influx de monocytes qui se différencient localement en macrophages. L'accumulation de cholestérol intracellulaire dans les macrophages conduit à la formation de cellules spumeuses qui produisent des médiateurs inflammatoires [15]. Les cellules de l'immunité acquise dont les lymphocytes T et B sont également recrutés au niveau de la lésion athéromateuse [16]. Beaucoup de ces lymphocytes T reconnaissent le LDL oxydé comme un antigène et participent à la réponse immunitaire et inflammatoire. D'autres antigènes sont également reconnus mais ils restent encore peu caractérisés. Une majorité de LT CD4 appartient au sous-type T helper de type I (Th1) qui produit des médiateurs pro inflammatoires tels que *l'interféron- γ* et le *Tumor Necrosis Factor* (TNF) [17,18]. Les médiateurs inflammatoires produits dans la paroi athéroscléreuse comprennent de l'interleukine 6 (IL6) et l'IL1 qui peut déclencher l'activation de la phase aiguë de la réponse inflammatoire au niveau hépatique, conduisant à la libération de CRP dans la circulation systémique [12]. La sécrétion de chimiokines (CCL2, CCL5 and CX₃CL1) [19] participe au recrutement continu de cellules immunitaires dans les plaques, et ainsi à la mise en place d'un état inflammatoire chronique. L'accumulation de lipides et de cellules spumeuses constitue progressivement un

cœur lipidique et nécrotique. Les CML de la média migrent vers l'intima et prolifèrent pour former une chappe fibreuse (principalement collagène I) qui recouvre ce cœur lipidique et assure la résistance mécanique de la plaque vis-à-vis des forces hémodynamiques.

Les complications sont le plus souvent dues à une rupture de cette chappe fibreuse due à la production de Matrix Metalloproteinases (MMP) par les cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles) qui dégradent le collagène et fragilise la plaque. Les facteurs et cofacteurs de la coagulation peuvent ainsi entrer en contact avec les constituants très pro-thrombotiques de la plaque, et la formation du thrombus peut alors bloquer la circulation sanguine et donner lieu aux expressions cliniques aiguës de la maladie (infarctus du myocarde, AVC, ischémie aiguë des membres).

Cette vision de l'athérosclérose et de ses complications, décrite dans la littérature depuis les 20 dernières années est aujourd'hui nuancée par la reconnaissance de l'hétérogénéité des types de plaques, associées à d'autres processus de complication. Pour l'érosion superficielle notamment, qui est associée à 25-33% des infarctus du myocarde, elle concerne des plaques relativement peu inflammatoires et peu lipidiques, mais largement fibreuses (protéoglycanes). Dans ces plaques, l'érosion superficielle, caractérisée par la desquamation des CE à la surface de la plaque, est médiée par l'activation conjointe des neutrophiles et de TLR2 [20]. Depuis quelques années, le rôle des calcifications et des hémorragies intraplaques semble être également déterminant dans la résistance mécanique de la plaque [21,22].

De multiples facteurs interviennent au cours de l'athérosclérose, les principaux sont discutés dans les sections ci-après.

1.2.1 Facteurs génétiques

Les facteurs génétiques ont un rôle important dans l'athérosclérose. Des genome-wide association studies (GWAS) ont identifié de nombreux single nucléotide polymorphisme (SNP) associés à une augmentation du risque coronarien [23]. L'association génétique la plus robuste est avec le SNP 9p21 qui est impliqué dans la transrégulation du signal IFN γ [24]. La plupart des loci qui sont associés à l'athérosclérose ne sont pas connus en terme mécanistique, bien que certains soient également impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines et les processus athérothrombotiques [25]. Cependant, le risque individuel attribué pour chaque locus est faible. Certains travaux ont identifié des loci du complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH) associés avec les maladies coronaires [26]. De même, les processus de régulation du CMH sont associés aux infarctus du myocarde [27] et certains haplotypes HLA sont associés à une augmentation du risque d'infarctus ou à l'inverse confèrent une certaine protection, mais à nouveau, ses associations sont faibles [28]. Ces données reflètent probablement le caractère complexe et multifactoriel de l'athérosclérose.

1.2.2 Rôle des infections au cours athérosclérose

Certaines publications suggèrent un lien entre les maladies infectieuses et l'athérosclérose. Dans un modèle de lapin, une infection à chlamydia pneumonie accélère le développement de l'athérosclérose [29–31] mais il n'y avait aucun effet dans un modèle d'infection à chlamydia pneumonie de souris [32]. En outre, des modèles de souris exposées à aucun micro-organisme ont montré que le développement de lésions d'athérosclérose était tout à fait possible et donc que les bactéries n'étaient pas nécessaire pour sa genèse [33]. Enfin, une méta-analyse d'essais contrôlés randomisés a montré qu'il n'existait pas de bénéfice sur l'athérosclérose des traitements antibiotiques anti chlamydiae en matière de mortalité et de réduction du nombre d'événements cardiovasculaires [34].

1.2.3 Différentes phases de l'initiation et progression athéromateuse

1.2.3.1 Hémodynamique, flux low shear stress, perméabilité et dysfonction endothéliale

L'hémodynamique joue un rôle central dans la mise en place de la maladie et de sa progression [35]. En effet, l'endothélium artériel n'est pas phénotypiquement homogène à travers le réseau vasculaire. Les lits vasculaires ne sont pas uniformément organisés. L'architecture artérielle varie grandement au niveau des bifurcations et des régions incurvées. Ces zones induisent des changements dans les flux sanguins, qui à leur tour présentent différents effets sur les cellules vasculaires. Hors de ces zones, on observe un flux laminaire pulsatile où les EC synthétisent des facteurs qui soutiennent la survie cellulaire, maintiennent la fonction de barrière endothéliale, inhibent la coagulation, l'extravasation des leucocytes et la prolifération des CML vasculaires [36]. Au niveau des bifurcations artérielles le flux sanguin n'est plus soumis aux contraintes de cisaillement unidirectionnelles mais a des

contraintes de cisaillements oscillantes qui comprennent l'inversion du flux et la turbulence (Figure 7). Soumises à ces conditions de perturbation des forces de cisaillement, les CE modifient leurs phénotypes pour augmenter la perméabilité des macromolécules plasmatiques, augmenter le turnover (prolifération et apoptose) et augmenter les propriétés d'adhésion des monocytes [37]. Des études cliniques ont démontré cette association entre la formation de plaques d'athérome et la dysfonction locale de l'endothélium au niveau de zones de flux non laminaire [38,39]. Les régions à écoulement laminaire unidirectionnel stable sont athéroprotectrices. Dans les régions artérielles à débit perturbé, les CE sont stressées et exposées à un risque plus élevé de perte des fonctions dépendentes du monoxyde d'azote (NO, cf partie suivante), et ainsi de formation de plaque d'athérosclérose [40].

Les forces hémodynamiques peuvent donc fortement influencer les phénotypes des CE qui présentent alors des réponses différentes à des facteurs de risque coexistants tels que l'hypertension, la dyslipidémie, le diabète et l'obésité et induisent une prédisposition spécifique à l'athérogenèse en fonction des territoires artériels.

Réciproquement, la formation et le développement de la plaque joue à son tour un rôle mécanique sur le flux sanguin et sur le remodelage vasculaire. Ce remodelage artériel est effectivement un autre déterminant majeur de l'athérosclérose dans la paroi vasculaire. Le remodelage est une caractéristique fondamentale des régions artérielles et fait référence à la tendance de la paroi artérielle à modifier localement sa forme et ses dimensions en réponse à des changements dans les conditions de plaque ou d'écoulement. Les remodelages artériels entraînent également des changements majeurs dans les caractéristiques locales d'écoulement sanguin et, par conséquent, modifient le stress de cisaillement endothélial (ESS) entourant les plaques individuelles, qui peuvent à leur tour continuer à influencer la pathophysiologie locale de la plaque (Figure 7). Le remodelage pariétal intéresse principalement les régions de bifurcation artérielles, où les flux sont les plus perturbés. En général, le remodelage positif ou expansif signifie que l'artère augmente de dimensions, tandis que le remodelage négatif ou constrictif correspond à une réduction de la taille artérielle. Dans le remodelage expansif compensatoire, la paroi artérielle s'agrandit pour s'adapter à la réduction de la lumière artérielle liée à la croissance de la plaque, de sorte que les dimensions de la lumière sont préservées [41]. Une réponse plus exagérée est observée dans les artères coronaires, c'est-à-dire un remodelage expansif excessif, est cependant associé à des indices de vulnérabilité de la plaque, à des événements cliniques indésirables et à des résultats à long terme moins bons [42–45].

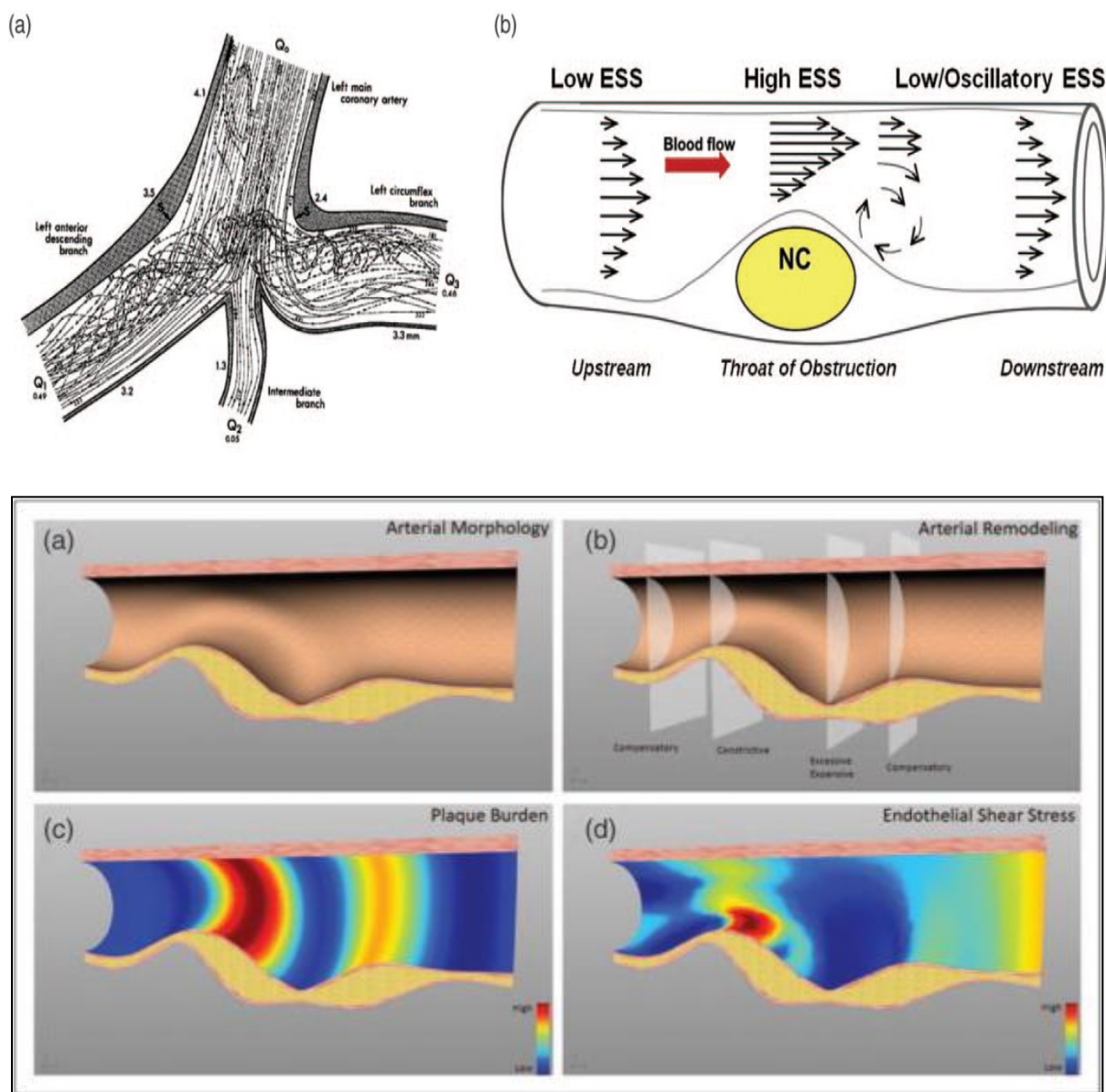


Figure 7: Illustration schématique de la variabilité longitudinale de la morphologie artérielle (a), du remodelage artériel (b), de la charge de plaque (c) et de la contrainte de cisaillement endothéliale (d) le long de la plaque [46].

L'athérosclérose présente une hétérogénéité significative dans la localisation des plaques au sein de l'arbre coronaire, qui est typiquement asymétrique. Une prédilection pour la formation de plaque est montrée dans les parois latérales des bifurcations ou des points de ramification, l'arche interne des segments incurvés, et en amont et en aval d'une obstruction luminale [47–50], où il y a des flux locaux et des ESS perturbés, (Figure 7). Les modes d'écoulement locaux perturbés et le faible ESS sont responsables de l'initiation et de la progression des lésions athéroscléreuses [51,52]. Les modifications dans le régime d'écoulement du flux sanguin vont être à l'origine d'une dysfonction endothéliale précoce qui contribuera à l'initiation de la

plaque d'athérosclérose [53]. De plus, le taux de progression et l'évolution temporelle des lésions athéroscléreuses chez un même patient est hétérogène. Les observations selon lesquelles des plaques de taille et de compositions différentes coexistent chez le même individu sont courantes, et au sein même de la même artère. L'histoire naturelle des lésions de la plaque est diverse et variable. Certaines plaques, même ostensiblement à haut risque, non-obstructives ou partiellement obstructives, peuvent rester cliniquement silencieuses tout au long de la vie. D'autres plaques empiètent dans la lumière et limitent significativement le flux sanguin d'une manière fixe se manifestant sous forme d'angor stable. Une grande proportion des plaques les plus à risque dans les artères humaines deviennent quiescentes avec le temps, possiblement à cause des réponses adaptatives au remodelage artériel [54–56] (Figure 8). Les zones artérielles avec des flux sanguins perturbés et soumises à de faibles ESS développent une plaque focale dans la paroi. Si le remodelage artériel compensatoire préserve les dimensions de la lumière [41], la plaque qui se forme peut ensuite devenir quiescente, car les perturbations d'écoulement peuvent se résoudre. Si, par contre l'ESS est sévèrement perturbé, alors les protéases inflammatoires s'expriment dans la plaque peuvent dégrader les constituants de la paroi artérielle [56,57] conduisant à un remodelage expansif excessif et, par conséquent, une exacerbation et une perpétuation de l'environnement proinflammatoire. Les plaques continueront à progresser et l'inflammation persistante pourrait contribuer à développer des plaques avec de phénotypes de fibro-athérome à chape mince avec une propension à se rompre. Les données actuelles suggèrent cependant que la grande majorité de ces plaques à haut risque deviennent quiescentes (Figure 9) [47,58], probablement liées à des réponses de remodelage artériel compensatoire [59]. Si l'environnement avec ESS faible persiste, la déstabilisation de ces plaques à haut risque peut se produire, aboutissant à une rupture de la plaque ou une hémorragie intraplaque et un nouvel événement clinique (Figure 8).

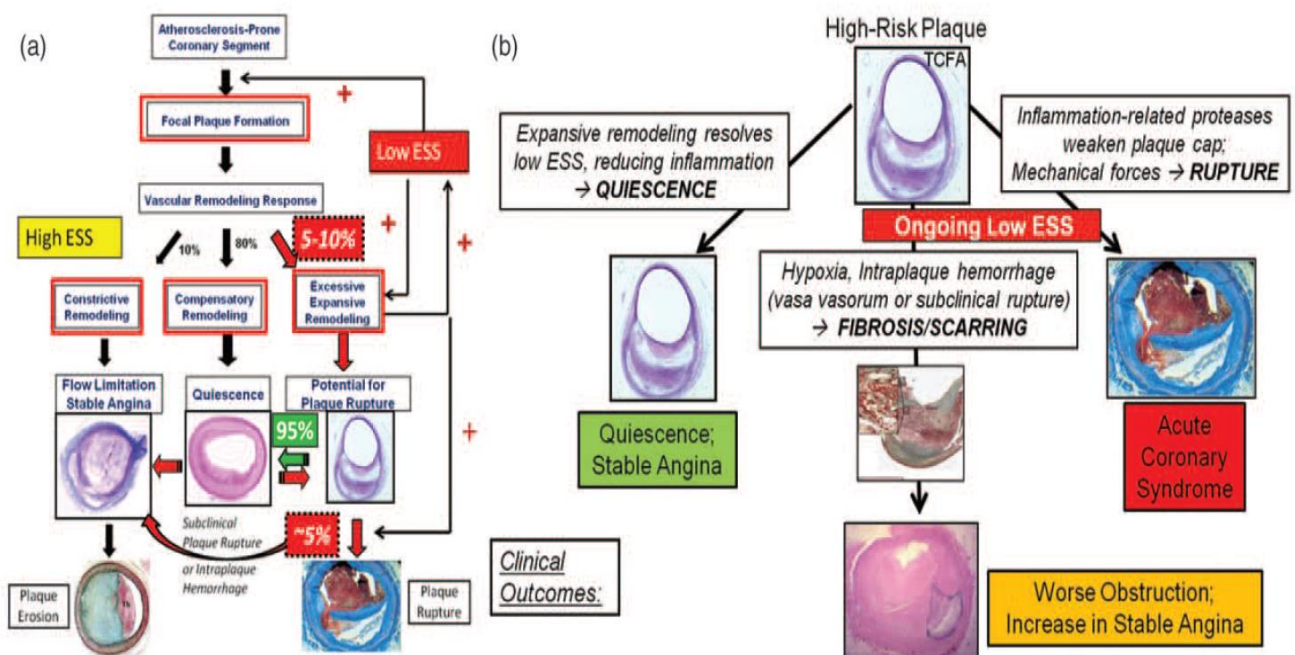


Figure 8: (a) Hypothèse proposée du rôle du stress de cisaillement endothélial local sur l'histoire naturelle de la maladie coronarienne et des plaques à haut risque. (b) Hypothèse proposée de la pathobiologie de la déstabilisation de la plaque [46].

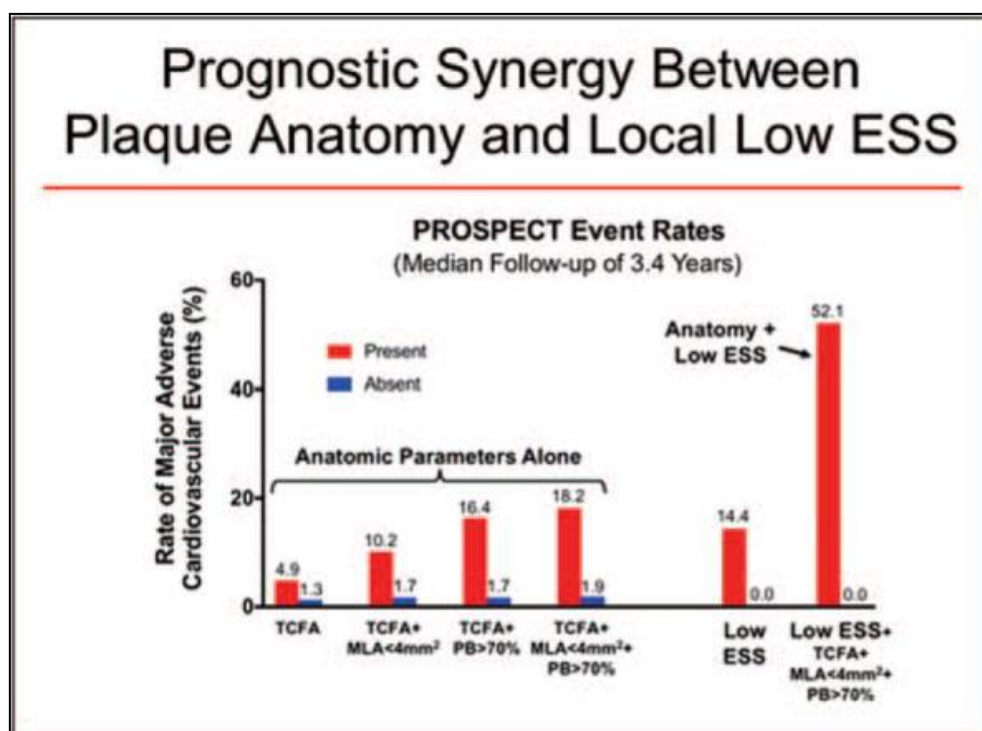


Figure 9: Effets pronostiques synergiques de la contrainte de cisaillement endothéliale locale et des caractéristiques anatomiques de la plaque, pour prédire les événements cardiaques indésirables majeurs [46].

1.2.3.2 Dysfonction endothéliale au cours de l'athérosclérose

Des perturbations de la fonction normale des CE contribuent à l'initiation et / ou à la progression de processus pathologiques cardiovasculaires. Ces perturbations peuvent résulter de blessures ou d'une activation pariétale qui modifient les fonctions régulatrices de l'endothélium, résultant d'un déséquilibre des facteurs vasorelaxants et vasocontractants, de médiateurs pro-coagulants et anticoagulants, et de ses propriétés chimiotactiques et inflammatoires [60]. Comme cité précédemment, les perturbations de flux peuvent provoquer localement une dysfonction endothéliale. Elles peuvent également être médiées et amplifiées par un stress oxydatif qui contribue directement à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires, telles que l'hypercholestérolémie, l'athérosclérose, l'hypertension, le diabète et l'insuffisance cardiaque [61,62]. Dans des conditions pathologiques, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) s'accumulent, ce qui peut compromettre la vasorelaxation endothéliale-dépendante en réduisant la biodisponibilité de la molécule de signalisation pluripotente NO [63].

Les ROS sont constituées d'un groupe de molécules, comprenant l'oxygène moléculaire et ses dérivés, qui sont produits dans tout le système vasculaire. Une production excessive de ces ROS peut submerger les défenses antioxydantes intrinsèques d'un tissu et contribuer à l'oxydation de l'ADN, des protéines, des glucides et des lipides [61], causant une perturbation de la fonction et finalement la dégradation des macromolécules touchées, ou les rendre pro-inflammatoires.

Dans les conditions athérosclérotiques (par exemple hyperlipidémie, syndrome métabolique), la dysfonction endothéliale est un facteur important contribuant à la formation de plaque, à la progression de la maladie [64]. L'athérosclérose est typiquement observée dans les artères de la macrocirculation (c'est-à-dire les diamètres intraluminaux >3 mm) [65] et n'est normalement pas détectée dans le système vasculaire de résistance. La diminution de la biodisponibilité du NO est une cause sous-jacente commune pour l'initiation et la progression de l'athérosclérose. Les mécanismes cellulaires responsables de cette pathogenèse comprennent des changements dans la transduction du signal endothélial dépendant du NO, par l'absorption réduite / baisse de disponibilité du substrat NO L-arginine, modification de l'expression de eNOS, réduction des cofacteurs enzymatiques pour l'activité de l'eNOS, et l'augmentation des ROS, entraînant la formation de peroxynitrite (ONOO-) [64]. La baisse de libération de NO favorise la formation de plaque et l'athérosclérose en raison de ses actions pléiotropiques : le NO est un vasodilatateur puissant par son action sur les CML, un

antiprolifératif, et sa production s'oppose à l'activation / agrégation plaquettaire ainsi qu'à l'interaction / adhésion des cellules immunitaires à la surface endothéliale [63,66].

1.2.3.3 Initiation de l'athérogenèse, accumulation de lipides dans la paroi artérielle

L'accumulation de cholestérol LDL au niveau de l'intima des artères est un élément central dans le développement de l'athérosclérose. La rétention des particules de LDL-cholestérol sur les protéoglycanes au niveau de l'espace sous endothélial est un événement initiateur dans la physiopathologie de l'athérosclérose [13,14]. Les lipoprotéines « piégées » sont modifiées biochimiquement par des protéases et des lipases conduisant à leur agrégation et à une augmentation de leur liaison aux protéoglycanes [67] ; les modifications oxydatives induites par les myéloperoxydases, les lipo-oxygenases et les espèces réactives de l'oxygène conduisent à la formation de LDL oxydé qui peut déclencher une réponse de l'immunité innée [16] (Figure 10). Les macrophages résidents ou recrutés dans ces plaques ou les lipides s'accumulent participent à l'efflux de cholestérol. Quand ce processus est déséquilibré et que les LDL s'accumulent dans les vésicules des macrophages, ils évoluent en cellules spumeuses dans l'intima. Il se crée ainsi progressivement une zone dans la plaque constituée de cellules apoptotiques et nécrotiques, de cristaux de cholestérol et d'autres matériaux extracellulaires [68].

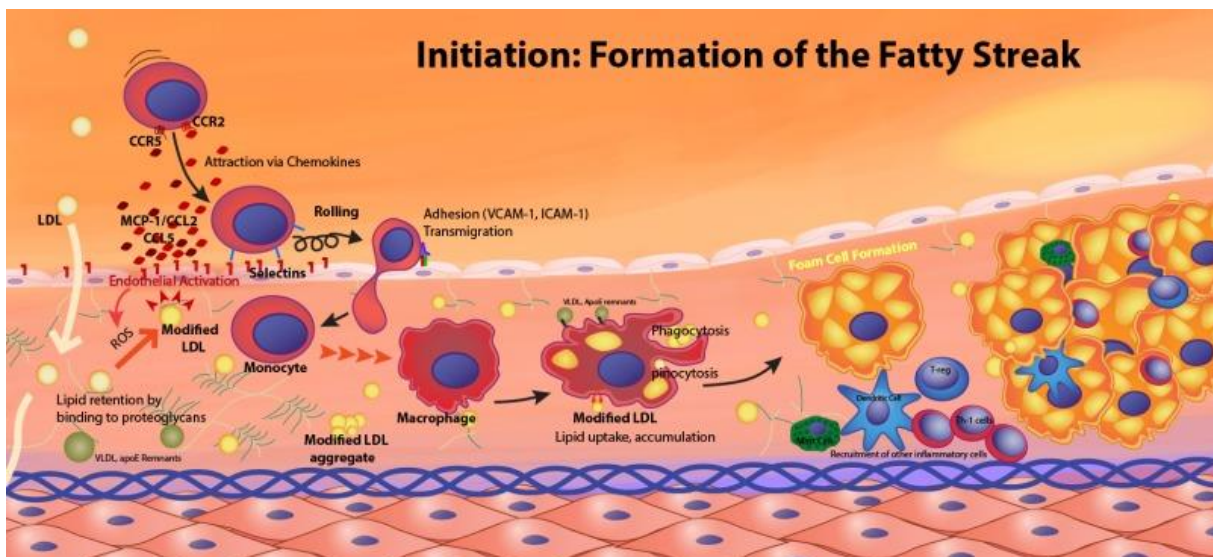


Figure 10: Initiation de la lésion athérosclérotique. La phase de stries lipidiques de l'athérosclérose commence avec une dysfonction endothéliale et la rétention de lipoprotéines contenant l'apoB (LDL, VLDL, et des restes d'apoE) dans l'espace sous-endothélial. Les lipoprotéines retenues sont modifiées (oxydation, glycation, enzymatique), ce qui favorise l'activation des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales activées ont une expression accrue de molécules d'interaction/d'adhésion de monocytes (sélectines, VCAM-1) et de chimioattractifs (MCP-1) conduisant à l'attachement et à la transmigration des monocytes dans l'espace intimal. Les cellules endothéliales activées favorisent également le recrutement d'autres cellules immunitaires comprenant des cellules dendritiques, des mastocytes, des cellules T régulatrices et des cellules T helper 1 (Th-1). Les monocytes se différencient en macrophages et expriment des récepteurs qui médient l'internalisation des

VLDL, des restes de l'apoE et des LDL modifiées pour devenir des cellules spumeuses. De plus, les voies de signalisation inflammatoires sont activées dans les cellules spumeuses, ce qui entraîne un plus grand recrutement cellulaire et une modification des LDL [69].

1.2.3.4 Recrutement des monocytes

Les cellules immunitaires jouent un rôle essentiel à la fois dans le développement et le maintien d'une plaque. Après s'être infiltrées dans l'espace sous-endothélial, les cellules immunitaires, et en particulier macrophagiques, absorbent les particules lipidiques et à libérer des substances pro-inflammatoires qui favorisent la migration et la dédifférenciation des CML vasculaires. En réponse à l'accumulation de lipoprotéines dans le sous endothélium, et dans certains sites artériels soumis à des régimes de flux turbulent, les cellules endothéliales vont exprimer des molécules d'adhésion comme les protéines d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM-1) [70,71] ; les monocytes circulant et d'autres leucocytes vont être recrutés sur ces sites mais également au niveau splénique. Les monocytes sanguins circulants sont une population hétérogène de cellules qui se différencient chez la souris par des marqueurs de surface, comme l'antigène lymphocytaire 6C (Ly6C), le récepteur des chimiokines CeC2 (CCR2), CD43 et le ligand CX3C-chimiokine 1 (CX3CR1) [72]. Les monocytes impliqués dans l'athérosclérose sont définis comme Ly6C high CCR2+ CD43low CD62L+ CX3CR1 intermediate, tandis que les monocytes non classiques sont Ly6C low CCR2- CD43 high CD62L- CX3CR1 high [73,74]. Les sous-ensembles de monocytes murins ont des équivalents chez l'homme : les monocytes classiques expriment des marqueurs de surface CD14 high CD16 low alors que réciproquement, les monocytes non classiques sont CD14 low CD16 high [75]. Les monocytes qui vont s'infiltrer vont se différencier en macrophages. En raison d'un recrutement continu des macrophages dérivés de monocytes sont la population cellulaire la plus représentée dans la plaque d'athérosclérose [76,77].

1.2.3.5 Différentes populations macrophages

Le phénotype des macrophages est plastique et largement déterminé par les signaux environnementaux. Les macrophages sont généralement divisés en sous-classes basées sur l'expression de marqueurs spécifiques, leur profil de sécrétion, et leur fonction. Les transitions entre ces phénotypes et les stades intermédiaires sont également observés. Pour simplifier, je présenterai les grands phénotypes les plus fréquemment décrits dans la littérature et les plus

caractéristiques des plaques [78–80]. On distingue des macrophages "classiquement activés" (M1) et "alternativement activés" (M2a, M2b ou M2c).

Les macrophages de phénotype M1 sont induits par l'IFN γ , le TNF α ou le lipopolysaccharide [81] et sécrètent des niveaux élevés d'IL12, d'IL23 et à des taux moindres l'IL10, TNF α , IL6 et IL1 β . Ils expriment la NADPH oxydase et génèrent des ROS, qui favorisent l'inflammation et nuisent à la cicatrisation [81]. Les macrophages de phénotype M2a sont préférentiellement induits par les cytokines IL4 et IL13, M2b par une combinaison de complexes immuns, de lipopolysaccharides, de cellules apoptotiques et d'IL1R α , et M2c par IL10, TGF β ou les glucocorticoïdes [82]. Les macrophages M2a et M2c favorisent la réparation et la cicatrisation des tissus par une production élevée d'IL10 et de TGF β [82]. En revanche, les macrophages M2b sécrètent des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires IL1, IL6 et TNF α notamment [83]. Les agonistes du récepteur A2A de l'adénosine agissent en synergie avec les agonistes de TLR2, TLR4, TLR7 et TLR9 pour transformer les macrophages en un phénotype appelé M2d. Les macrophages M2d expriment des niveaux élevés de VEGF, IL10 et iNOS, de faibles niveaux de TNF α et IL12, et des niveaux légèrement élevés d'arginase 1 [84]. Les macrophages M2d sont supposés présenter des fonctions de réparation tissulaire [84].

Une plasticité extrême des macrophages a été observée dans l'athérosclérose [85]. Dans les lésions athéroscléreuses, les macrophages sont continuellement exposés aux lipides et à leurs dérivés oxydés, qui définissent leurs phénotypes ou conduisent à des changements particuliers dans le programme transcriptionnel et l'activation inflammatoire des macrophages [86]. Les cristaux de cholestérol déclenchent la polarisation des macrophages M1 via l'activation de l'inflammasome NLRP3 et l'induction de la caspase-1 et la sécrétion subséquente des cytokines hautement pro-inflammatoires IL1 β et IL18 [87]. Les LDL et les esters de cholestérol oxydés induisent également la polarisation de M1 via l'activation des voies de signalisation TLR4 ou NF κ B [88]. Inversement, le 9-oxononanoyl-cholestérol ou le sphingosine-1-phosphate induisent des macrophages de phénotype M2 [89,90]. L'exposition aux phospholipides oxydés peut également entraîner chez les souris des macrophages « Mox », qui représentent environ 30% du nombre total de macrophages à l'avant des lésions athéroscléreuses. Les macrophages de phénotype Mox sont caractérisés par des capacités phagocytaires et chimiotactiques diminuées et par l'expression de gènes régulateurs redox médiés par NFE2L2, la production d'IL1 β et de cyclooxygénase 2 [91]. Les macrophages de Mhem chez l'homme sont un sous-type de macrophage athéroprotecteur, qui exprime le facteur de transcription activateur hème-dépendant 1 (ATF1) en plus de CD163. Ils éliminent l'hémoglobine via la phagocytose érythrocytaire, et pourraient donc être importants dans la

résorption des hémorragies intraplaques. Ils augmentent également l'efflux de cholestérol [92] et produisent l'IL10 et l'ApoE [93].

Les macrophages principalement inflammatoires favorisent la progression de l'athérosclérose en sécrétant des cytokines, des protéases telles que les MMPs et d'autres facteurs. Ils provoquent la nécrose et l'amincissement de la chape fibreuse protectrice, favorisant ainsi la rupture de la plaque et la thrombose luminale. À cet égard, les macrophages inflammatoires ont été trouvés abondamment dans les plaques vulnérables à la rupture [94,95]. En revanche, des macrophages activés alternativement sont présents dans les plaques stables et favorisent les fonctions de stabilisation de la plaque comme l'efférocytose (élimination des cellules mortes), et la réparation tissulaire en stimulant notamment la production de MEC par les CML [96].

La prolifération de macrophages se produit dans les plaques avancées. Fait intéressant, la déficience hétérozygote de Zfp148 dans les cellules hématopoïétiques, ou l'inhibition de la HMG-CoA réductase (statines), en bloquant respectivement P53 et l'activation de Ras, entraîne une diminution de la prolifération macrophagique lésionnelle et de l'inflammation de la plaque [97,98]. Collectivement, ces résultats suggèrent que le phénotype et la fonction des macrophages peuvent être modulés avec succès et utilisés dans le traitement de l'athérosclérose.

1.2.3.6 Formation de cellules spumeuses

L'afflux continu de lipoprotéines conduit à la transformation de macrophages en cellules spumeuses [99], les macrophages expriment des récepteurs scavenger parmi lesquels le récepteur scavenger de classe A et le CD36 qui sont les plus importants pour l'absorption du LDL [100]. Contrairement aux récepteurs LDL, les récepteurs scavenger ne sont pas régulés à la baisse en réponse au taux de cholestérol intracellulaire. Les cellules spumeuses ont une capacité de migration réduite et sont piégées dans l'intima des artères [101]. Elles finissent par mourir et créent une zone centrale dans la plaque qui se compose de cellules apoptotiques et nécrotiques, de cristaux de cholestérol et d'autre matériel extracellulaire.

1.2.3.7 Apoptose, nécrose/ nécroptose, et autophagie au cours de l'athérosclérose

L'apoptose, aussi appelée mort cellulaire programmée, implique des voies de signalisation finement contrôlées qui induisent le rétrécissement de la membrane cellulaire, la formation de

vésicules membranaires, la condensation nucléaire et cytoplasmique, et enfin la fragmentation cellulaire. Ce processus, contrairement à la nécrose/nécroptose, est non inflammatoire et tolérant [102]. L'apoptose peut être déclenchée de manière extrinsèque via la voie initiée par le récepteur de mort, ou intrinsèquement via les mitochondries, les deux voies aboutissant à l'activation des caspases et à la mort cellulaire [103,104]. La voie apoptotique extrinsèque est initiée lors de l'activation des récepteurs de mort de la superfamille du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNF) (TNFR) comprenant TNFR1, Fas, récepteurs de mort-4 et -5 (DR4, DR5). Ces récepteurs sont activés lors de l'engagement de leur ligand sur la membrane cellulaire : TNF α (pour TNFR1), Fas ligand (pour Fas), et ligand induisant l'apoptose lié au TNF (TRAIL, pour DR4 / 5). Ces interactions conduisent au recrutement du complexe de signalisation DISC, composé de Fas-associated death domain (FADD) et pro-caspase-8 (ou -10). La formation de DISC et son recrutement dans le complexe ligand-récepteur initie l'activation de la caspase-3 entraînant l'apoptose des cellules (Figure 11).

La nécroptose est un processus menant à la lyse cellulaire, elle fait intervenir de nombreux acteurs communs à l'apoptose.

Un certain nombre de facteurs athérogènes *in vitro* ont été identifiés pour induire l'apoptose des macrophages, y compris IL23, TNF α , Fas, les ROS, le NO, l'hypoxie, des concentrations élevées de LDL oxydé (oxLDL), le dysfonctionnement mitochondrial, la résistance à l'insuline, les oxystérols et l'accumulation intracellulaire de cholestérol non estérifié [105–107]. *In vivo*, l'apoptose des macrophages est la plus multifactorielle. Dans l'athérosclérose précoce à intermédiaire, les macrophages dérivés de monocytes englobent le cholestérol libre ou les lipoprotéines modifiées. Ce cholestérol est modifié et estérifié en esters de cholestérol (CE) pour former des gouttelettes de lipides [108]. L'accumulation de cholestérol active le réticulum endoplasmique, puis active la réponse protéique C / EBP (CHOP) qui augmente l'activité de la calmoduline kinase II, et augmente la signalisation des récepteurs de mort et la dysfonction mitochondriale associée à l'apoptose [109,110] (Figure 11).

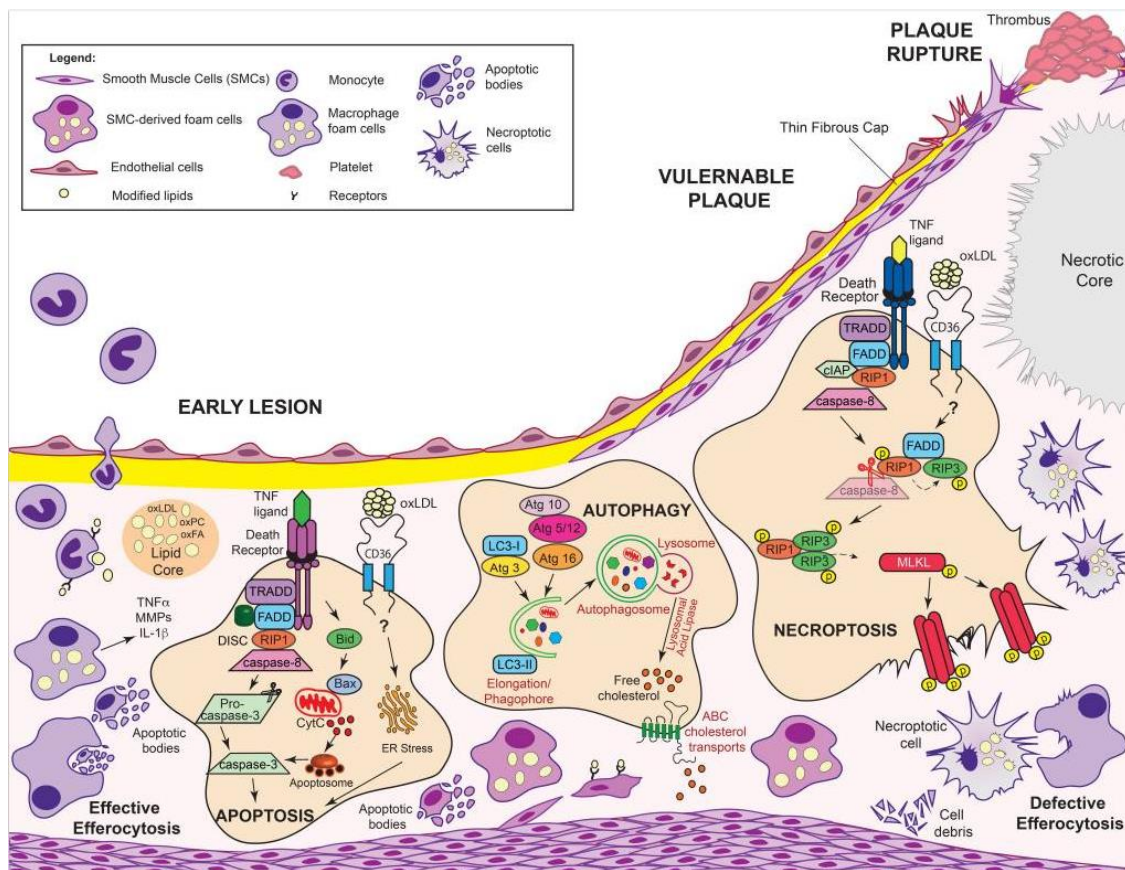


Figure 11: Apoptose des macrophages, autophagie et nécroptose dans l'athérosclérose. Dans les lésions précoces, les lipoprotéines modifiées agissent comme des stimuli inflammatoires dans la paroi du vaisseau pour recruter des monocytes circulants, qui phagocytent avidement ces lipides modifiés pour devenir des cellules spumeuses de macrophages. Ces cellules subissent ensuite trois principaux types de mort cellulaire dans la paroi vasculaire : l'apoptose, la mort cellulaire liée à l'autophagie et la nécroptose. Les macrophages qui subissent l'apoptose peuvent être efficacement efferocytés pour être éliminés par d'autres macrophages (violet), alors que les macrophages nécroptotiques sont efferocytés inefficacement (gris), entraînant l'accumulation de stimuli inflammatoires dans l'intima qui propage l'athérosclérose. Ensemble, à la fois l'augmentation de la mort cellulaire et l'efférocytose défectueuse aboutit finalement à la formation du noyau nécrotique, qui est la marque d'une plaque vulnérable à la rupture [111].

D'autres processus de réponse au stress et de mort cellulaire interviennent dans la progression de la plaque comme l'autophagie, la nécroptose (qui entraîne l'arrondissement des cellules, le gonflement cytoplasmique, la perte de l'intégrité de la membrane et la libération de tout le contenu intracellulaire) [112]. L'efférocytose participe quant à elle à l'élimination rapide et efficace des cellules mortes. Elle est essentielle pour maintenir l'homéostasie tissulaire. La phagocytose des corps apoptotiques par l'engloutissement de particules condensées de différentes tailles est plus efficace d'un point de vue cinétique et quantitatif que celle des cellules nécrotiques, plus inflammatoires, qui sont internalisées en petites particules cellulaires [113].

1.2.3.8 Chape fibreuse et stabilité de la plaque

Les CML et le collagène jouent un rôle central dans la stabilité de la plaque. Le Transforming Growth Factor (TGF)- β augmente la synthèse de collagène par les CML et stimule la maturation du collagène extracellulaire [114,115]. Le collagène mature en triple hélice apporte une résistance mécanique à la chape fibreuse alors qu'à l'inverse, l'IFN- γ est un puissant agent déstabilisateur qui inhibe la différenciation des CML ainsi que la maturation du collagène [114,116,117]. Certaines métalloprotéinases matricielles (MMPs) dégradent les fibres de collagène et favorisent ainsi la vulnérabilité de la plaque [118]. Les macrophages inflammatoires et les mastocytes, communément retrouvés sur les sites de rupture de plaque, sont les principaux sécrétateurs de ces protéases qui dégradent la matrice et activent d'autres métalloprotéinases matricielles [119]. Les CML et CE activées sont en outre des sources supplémentaires de MMPs dans les plaques [118]. De même, certaines élastases comme MMP12, interviennent dans la régulation des plaques en particulier pour les accidents vasculaires cérébraux de type ischémique [120]. D'autres acteurs comme MMP2 ont plutôt un effet de stabilisation de plaques alors que cathepsin B, MMP1, -8, -9, -12, -13 et -14 sont plutôt associés à des facteurs qui déstabilisent la plaque d'athérome [121].

1.2.3.9 Implication de l'immunité innée

Comme présenté précédemment, le rôle central de l'immunité innée dans l'athérosclérose est reflété par l'implication majeure des macrophages "classiquement activés" (M1) et "alternativement activés" (M2a, M2b ou M2c). En terme moléculaire, les LDL oxydés favorisent l'activation des macrophages dans les lésions d'athérosclérose, les macrophages activés expriment certains Toll-like récepteurs (TLR) [122] qui reconnaissent des « damage-associated molecular patterns (DAMP) ». Les LDL modifiés et leurs produits peuvent être des ligands pour les TLR2 et 4 [123,124]. De plus, certains signaux pro-athérosclérotique sont médiés par d'autres cytokines inflammatoires comme l'IL1 β et l'IL18 [125]. Par ailleurs, les cristaux de cholestérol dans les cellules spumeuses peuvent activer l'inflammasome par le biais de NLRP3 conduisant à un relargage d'IL1 β , ce qui amplifie la réaction inflammatoire. Ces voies montrent le lien entre le métabolisme du cholestérol et l'activation des acteurs moléculaires de l'immunité innée [87,126].

De plus, l'hyperlipidémie et l'athérogenèse médiées par les neutrophiles sont bien reconnues [127–129] comme des éléments participant à la déstabilisation de la plaque [130]. Une

corrélation directe entre la numération sanguine des neutrophiles et la gravité des lésions coronariennes a également été démontrée [131]. Chez l'homme, CD177 et CD66b sont des marqueurs spécifiques des neutrophiles [128]. Il a été démontré que l'expression de CD66b est en corrélation avec les zones sensibles à la rupture de la plaque d'athérosclérose [132], ce qui pourrait s'expliquer par la sécrétion de protéases neutrophilaires accélérant l'instabilité de la plaque [133]. Il a été démontré que l'hypercholestérolémie induit le facteur stimulant les colonies de granulocytes (G-CSF), ce qui déclenche la prolifération des précurseurs myéloïdes et réduit les taux de CXCL12 dans la moelle osseuse, entraînant une diminution de l'élimination des neutrophiles âgés [134]. De plus, l'hypercholestérolémie augmente les taux de CXCL1, ce qui favorise la mobilisation des neutrophiles via CXCR2 [134]. Le recrutement artériel des neutrophiles est principalement facilité par la liaison de CCL5 aux récepteurs de chimiokine CC de type 1 (CCR1) et CCR5 qui, avec CXCR2, CCR2 et ICAM-1, permettent leur recrutement [134,135]. L'expression de protéines granulaires, restreintes aux neutrophiles, a été identifiée dans les lésions athérosclérotiques humaines [122,136]. Il a également été montré que les neutrophiles stimulent l'adhésion à l'endothélium et l'infiltration de monocytes et de macrophages dans la paroi artérielle [134] par la libération de facteurs tels que l'azurocidine, les alpha-défensines PR3 (aka HNPs), les protéines granulaires monocytaires cathepsine. G, la cathélicidine et facilitent la signalisation trans IL-6 [137–140].

Plus récemment, il a été montré que les neutrophiles sont particulièrement associés à l'érosion superficielle, à travers l'association de taux sanguins plus élevés de myeloperoxydase ((fortement exprimée par les neutrophiles), et la présence de NETs (Neutrophiles extracellular Traps) avec ce type de plaques et de complication [20,141].

Enfin, les cellules NK et les mastocytes interviennent également au cours de l'athérosclérose mais leur rôle est moins caractérisé que celui des neutrophiles et des macrophages.

1.2.3.10 Implication de l'immunité adaptative

CMH

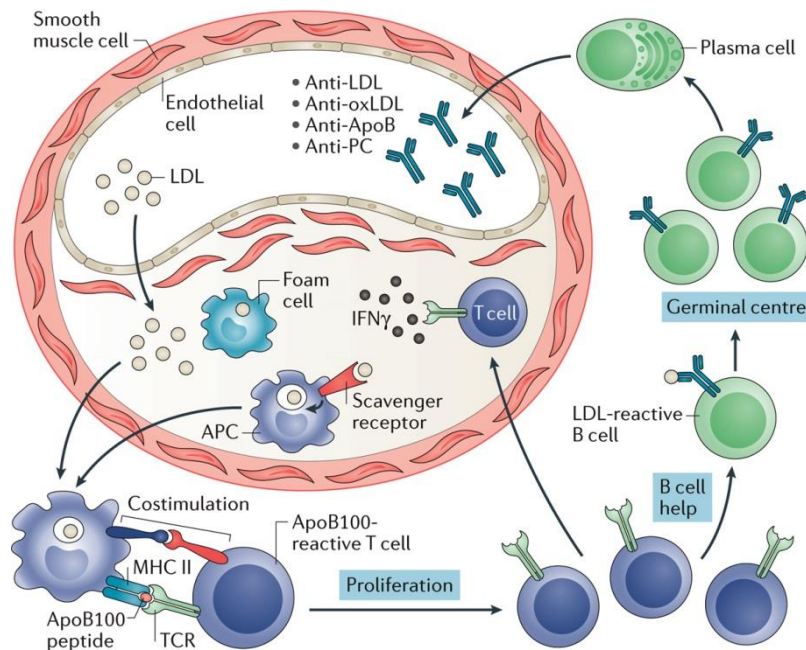
Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes sont présents dans la plaque d'athérosclérose à de nombreux stades de la maladie [16]. Les cellules endothéliales activées par l'inflammation surexpriment les molécules de CMH II comme de costimulation et peuvent ainsi favoriser l'activation lymphocytaire dès leur recrutement dans la plaque. Les macrophages sont également de bonnes cellules présentatrices d'antigènes dans le cadre de

l'athérosclérose. Enfin, les cellules dendritiques situées dans l'adventice et dans l'intima présentent certains antigènes de la plaque d'athérosclérose localement et à distance après une migration dans les nodules lymphatiques aux cellules T naïves [142].

Certains auto-antigènes dérivant des particules de LDL sont fréquemment retrouvés au cours de l'athérosclérose. Il existe des anticorps anti LDL oxydés, ce qui indique que les cellules B ont reconnus ces antigènes présentés par les CPA de la plaque [143]. Ces anticorps sont plus prévalents chez les patients avec une maladie coronarienne par rapport aux contrôles sains [144].

Immunité cellulaire

Les cellules T activées représentent une population importante de la plaque d'athérosclérose [145,146]. On retrouve des lymphocytes T CD8 qui sont fréquents au stade précoce de la maladie, mais ils ont moins d'influence que les lymphocytes T CD4, qui sont le principal effecteur cellulaire dans les plaques d'athérosclérose [147,148]. Les lymphocytes T CD4 helper réagissent avec des fragments peptidiques issus de la protéine apo-B 100 du LDL [17,149]. Différentes sous populations lymphocytaires interviennent, les Th1 qui sécrètent l'IFN γ favorisent l'infiltration monocytaire et modulent la formation des cellules spumeuses [150,151]. Les cellules Th2 dans la plaque sont plus rares que les Th1[18,152]. Leur rôle n'est pas clair. Ils synthétisent un certain nombre de cytokines qui ont des effets opposés au cours de l'athérosclérose [153]. On retrouve également des lymphocytes Th17, ils sont en très faible quantité dans la plaque [154], leur rôle est mal connu. Ils pourraient avoir un rôle dans la stabilisation de la plaque [155]. Les lymphocytes T régulateurs sont présents à tous les stades de la plaques [156], ils modèrent la progression des lésions d'athérosclérose [157]. Les cellules B sont rarement détectées dans la plaque d'athérosclérose, mais la présence d'anticorps spécifiques de la plaque a bien été documenté [158,159] (Figure 12).



Nature Reviews | Nephrology

Figure 12 : Auto-immunité liée au LDL dans l'athérosclérose. Des fragments peptidiques de la protéine apolipoprotéine B100 de LDL sont présentés sur des molécules de CMH de classe II à des lymphocytes T par des cellules présentatrices d'antigène. Les cellules T réactives à ApoB100 deviennent activées et prolifèrent. Ces cellules T peuvent aider les cellules B qui réagissent à divers épitopes de particules de LDL afin de changer de classe et pour former des réactions du centre germinatif. Les plasmocytes qui émergent de ces centres sécrètent des anticorps de haute affinité dans la circulation, par exemple des anticorps anti-LDL, anti-LDL (anti-oxLDL), anti-ApoB et anti-phosphorylcholine. Les lymphocytes T réactifs à l'ApoB100 sont également présents dans les plaques athérosclérotiques et peuvent sécréter l'interféron- γ (IFN γ), qui active les macrophages et module la formation des cellules spumeuses. TCR, récepteur des cellules T [159].

1.2.4 Classification anatomopathologique de l'athérosclérose humaine

1.2.4.1 Classification anatomopathologique de l'athérosclérose humaine

La physiopathologie de l'athérosclérose telle qu'elle est décrite ci-dessus est largement admise et caractéristique de la majorité des complications aiguës coronariennes qui ont été le centre de l'attention des recherches au cours des dernières décennies. Les plaques ne sont toutefois pas toutes égales. Un nombre grandissant d'études montrent des différences histologiques notables entre plaques d'athérosclérose.

L'American Heart Association (AHA) a établi une classification de ces lésions d'athérosclérose. Actuellement, 9 stades ou types de plaques sont identifiés[160–162] (Figure

13 et 14). Certaines plaques peuvent également rassembler des caractéristiques de plusieurs de ces types.

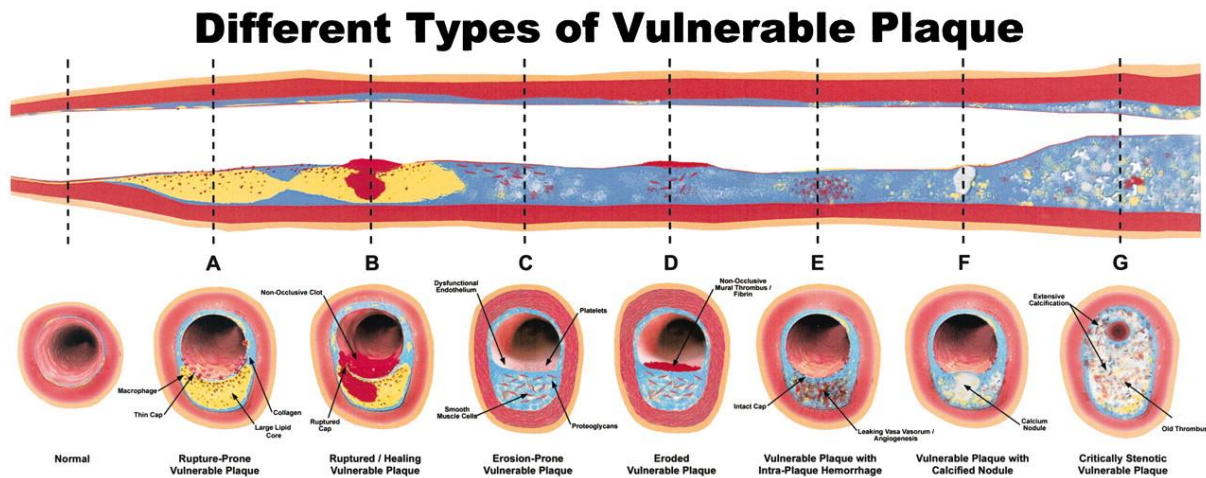


Figure 13: Différents types de plaque vulnérables pouvant favoriser les événements coronariens aigus et de la mort subite cardiaque. A, plaque sensible à la rupture avec un grand cœur lipidique et une mince chape fibreuse infiltrée par des macrophages. B, Plaque rompue avec thrombus sub-occlusif et organisation précoce. C, plaque sensible à l'érosion avec une matrice de protéoglycanes dans une plaque riche en CML. D, plaque érodée avec thrombus sub-occlusif. E, hémorragie intraplaque secondaire à une rupture de vasa vasorum. F, nodule calcifié faisant saillie dans la lumière du vaisseau. G, plaque chronique sténosante avec calcification sévère, thrombus ancien et lumière excentrique [163].

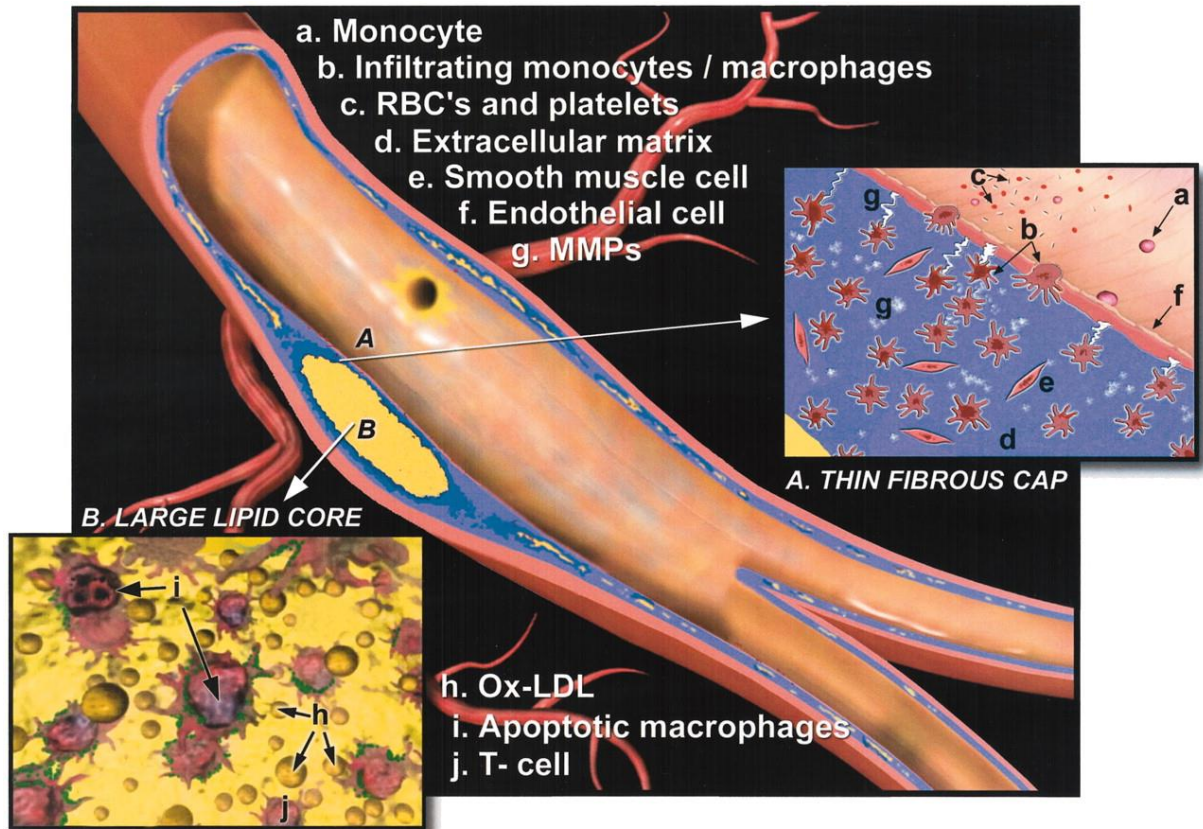


Figure 14: Plaque athéromateuse vulnérable caractérisée par une fine chape fibreuse, une infiltration macrophagique étendue, une carence en cellules musculaires lisses et un grand cœur lipidique, sans rétrécissement significatif de la lumière [163].

Lésions de type I ou lésion initiale

Il s'agit de lésions microscopiques présente chez l'enfant et l'adolescent, qui sont caractérisées par une infiltration de l'intima par des cellules spumeuses macrophagiques, en faible quantité, détectable uniquement par un examen microscopique. L'accumulation de ces cellules dans l'intima induit une augmentation de l'adhésion des monocytes à l'endothélium et favoriser l'évolution vers le stade II.

Lésion de type II ou stries lipidiques

Au niveau de la couche sous endothéliale de l'intima, on observe une accumulation de cellules phagocytaires, regroupées en petits amas, macroscopiquement visible (les stries lipidiques). Les cellules spumeuses sont considérées comme des macrophages, cependant certains auteurs considèrent que cette activité phagocytaire est le fruit des CML. Les lipides sont principalement intracytoplasmiques. Ils sont composés d'esters de cholestérol regroupant le cholestérol et les phospholipides. Ces lésions lipidiques sont recouvertes par un endothélium. Il est possible de distinguer de type de lésion de type II : Des lésions de type IIa qui sont rares, et peuvent donner des lésions de type III, elles sont caractérisées par la présence de plusieurs couches superposées de CML. Il existe également des lésions de type IIb qui contiennent peu de CML et qui ne progressent pas ou peu. Les lésions de type I et II sont observées avec une prévalence élevée, proche de 50% à l'âge d'un an, puis leur fréquence diminue au cours de l'enfance avant d'augmenter à l'adolescence pour toucher près de deux tiers des sujets de 10 à 15 ans.

Lésions de type III ou préathéromateuse

Il s'agit de lésions irréversibles, elles apparaissent chez l'homme entre 10 et 20 ans. Elles sont caractérisées sur le plan histologique par la présence de dépôts lipidiques extracellulaires qui sont identiques à ceux retrouvés dans les lésions de type II, mais plus nombreux et plus localisés. Ces dépôts sont à proximité des cellules spumeuses et phagocytaires disposées en multiples couches. Ils remplacent la matrice extracellulaire (MEC) de protéoglycanes, déplaçant ainsi, les CML en position intima. A l'instar des lésions de type II, de nombreuses CML intimes contiennent des gouttelettes lipidiques. Les lésions de type III sont infracliniques.

Lésion de type IV ou athéromateuse

Elles sont présentes chez l'homme à partir de l'âge de 20 à 30 ans, elles sont caractérisées par des regroupements des vésicules lipidiques extracellulaires. Celles-ci confluent et fusionnent

pour former le cœur lipidique (ou cœur nécrotique) qui est une zone avec une faible cellularité. Ce cœur lipidique précède la formation d'un tissu fibreux tout autour du cœur lipidique, il désorganise profondément l'intima. Les CML et les fibres de la MEC sont désorganisées par la présence de particules lipidiques. Les cristaux de cholestérol font leur apparition notamment au niveau extracellulaire. On note l'apparition de dépôts de calcium ainsi que la présence de capillaires bordant le cœur lipidique. Les cellules phagocytaires, les cellules spumeuses et les lymphocytes T sont plus représentés à la surface de la lésion mais il persiste une couche de protéoglycanes au niveau du sous endothélium qui est sans anomalie structurale, celle-ci est cependant infiltrée par des cellules inflammatoires et des cellules avec un cytoplasme riche en lipides. Ces lésions évoluent soit vers une plaque fibreuse (type V), soit vers une plaque rompue (type VI).

Lésion de type V ou fibrose athéromateuse

Les lésions apparaissent après 40 ans, elles sont caractérisées par la présence de tissu fibreux au niveau de l'intima. Ce tissu fibreux est riche en collagène et en CML, il entoure le cœur lipidique et forme une chape fibreuse. Il peut exister des calcifications qui se retrouvent préférentiellement dans les cœurs lipidiques. Dans le tissu fibreux, on retrouve principalement des CML et de la MEC ; au niveau du centre nécrotique il y a plus de cellules inflammatoires. Les lipides disparaissent dans les lésions de type V, ces lésions entraînent le plus souvent des sténoses artérielles qui sont la plupart du temps asymptomatiques dans les vaisseaux de grand diamètre comme l'aorte mais elles peuvent être symptomatiques au niveau des carotides ou des artères coronaires.

Lésion de type VI dite compliquée

Les plaques compliquées vont être responsable de la majorité des événements aigus. Il existe différents sous types de lésions compliquées :

Lésions de type VIa caractérisées par la présence de fissures à la surface de la lésion. On observe une rupture de la couche endothéliale ou une érosion avec une perte de substance minime [164,165]. La fissuration peut-être plus profonde, atteignant le cœur lipidique et entraînant un relargage de particules lipidiques dans le sang qui parfois emporte la totalité de la plaque. De façon plus exceptionnelle, la fissure peut atteindre la média avec l'apparition de faux anévrisme.

Les Lésions de type VIb sont caractérisées par la présence d'une hémorragie ou d'un hématome intraplaque, conséquence d'une rupture de néovaisseaux sous l'effet des contraintes hémodynamiques.

Les Lésions de type VIc sont caractérisées par l'apparition d'un thrombus ; il existe une mise en contact des éléments du sous endothélium avec le sang circulant qui est à l'origine de l'initiation du processus thrombotique avec une adhésion et une agrégation plaquettaire suivies de la formation d'un thrombus pariétal. Si ce processus survient sur des artères de moyen calibre, la thrombose est fréquemment occlusive. Le thrombus non occlusif, va être incorporé dans la plaque athéromateuse et va contribuer à la majoration de la sténose artérielle.

Lésion de type VII ou lésion calcifiée

Il s'agit de plaques qui sont majoritairement calcifiées.

Lésion de type VIII ou lésion fibrotique

Elles sont caractérisées par une plaque dont le composant principal est la fibrose.

Lésion de type IX ou occlusion chronique

Elles sont caractérisées par une artère complètement occluse de façon ancienne, il n'existe pas de thrombus frais, l'artère est occlusive soit par une plaque d'athérome ou le plus souvent par du tissu conjonctif.

Les modalités de l'évolution des plaques d'athérosclérose au cours de leur développement ne sont pas clairement élucidées. Les mécanismes qui gouvernent la progression de ces plaques sont probablement différents en fonction du territoire artériel et de la composition des plaques d'athérosclérose. Cette hétérogénéité des plaques, décrite plus en détail dans les paragraphes 1.5, page 77, suggère que les stades précoces des différents types de plaques avancées pourraient être eux même différents, en particuliers entre territoires vasculaires périphériques.

Pour rappel, les maladies artérielles périphériques — dont l'athérosclérose est la forme principale — touchent plus de 200 million d'individus dans le monde, en progression globale de 23.5%, et jusqu'à 49% au delà de 84 ans au cours des 20 dernières années [166].

Dans ce contexte d'hétérogénéité, nous avons souhaité étudier un aspect particulier des plaques périphériques que sont les calcifications artérielles qui s'y développent. En effet, à ce jour, il n'existe pas de prise en charge clinique en termes de prévention et de traitement.

1.3 Calcifications artérielles

Les calcifications artérielles impactent directement le pronostic des patients, et sont globalement étroitement et indépendamment associées aux complications cardiovasculaires. Elles sont critiques dans la physiopathologie de l'athérosclérose, de par leur impact sur la stabilité de la plaque et de par leur capacité à initier la formation de thrombus quand elles sont au contact direct de la circulation.

La formation de petits nodules de calcifications proches de la lumière participe à l'instabilité de la plaque en augmentant le stress mécanique dû aux forces hémodynamiques à l'interface entre ces particules dures et les composés mous de la lésion (ex lipides). Ces nodules sont considérés comme des calcifications sporadiques et sont associées aux événements cardiovasculaires [167]. Une calcification plus dense, étendue et profonde dans la plaque peut quant à elle stabiliser la plaque.

Toutefois, toutes ces calcifications confèrent une rigidité parfois extrême aux artères, qui perdent toute capacité élastique, et participent ainsi à l'hypertension artérielle, augmentant ainsi le stress mécanique sur d'autres plaques à risque de rupture. Enfin, la rigidité extrême de ces plaques et artères rend les interventions chirurgicales plus difficiles et met en jeu l'efficacité des traitements endovasculaires en particulier des stents [168–171].

Ces calcifications atheromateuses sont distinctes en fonction des localisations et parfois différentes au sein d'un même territoire. Nous décrirons dans un premier temps les différents types de calcifications puis les principaux mécanismes qui contribuent à leur régulation.

1.3.1 Aspects histologiques des calcifications artérielles

Les calcifications artérielles résultent du dépôt de calcium dans une ou plusieurs couches de la paroi artérielle [172], elles sont couramment observées au cours de l'athérosclérose, des maladies rénales chroniques ou du diabète. L'ensemble de l'arbre artériel est sujet aux calcifications. Il existe quatre principales atteintes cliniques qui sont chacune les conséquences de pathologies vasculaires spécifiques (Figure 15) :

- Calcifications intimes au cours de l'athérosclérose,
- Calcifications médiales,
- Calciphylaxie,

- Calcifications valvulaires aortiques.

Des études anatomopathologiques ont démontré que le calcium est principalement sous forme d'hydroxyapatite (phosphate de calcium – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_5(\text{Mg}, \text{Fe}^{2+})(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{Cl}, \text{F})$ pour hydroxyapatite et apatite) dans les calcifications associées à l'athérosclérose [173], aux maladies rénales chroniques et au diabète [174], tandis que la carbapatite a été retrouvée dans les valves aortiques [175]. Dans les modèles expérimentaux, la calcification artérielle peut être induite, souvent par des niveaux toxiques de vitamine D et / ou de nicotine, où le sel de calcium se révèle être de la whitlockite ($\text{Ca}_9(\text{MgFe})(\text{PO}_4)_6\text{PO}_3\text{OH}$) [176], jetant le doute sur l'utilité des études animales comme modèles de calcification. Une structure cristalline d'hydroxyapatite et de whitlockite a également été observée dans les artères iliaques des patients dialysés avant la transplantation rénale [177]. La présence d'hydroxyapatite suggère que les calcifications cardiovasculaires sont dues à un processus de biominéralisation similaire à l'ostéogenèse [178]; en effet, des structures typiquement osseuses ont été observées dans 13 à 15% des lésions de l'artère carotide calcifiée [179] ainsi que dans les valvules et l'artère coronaire [180].

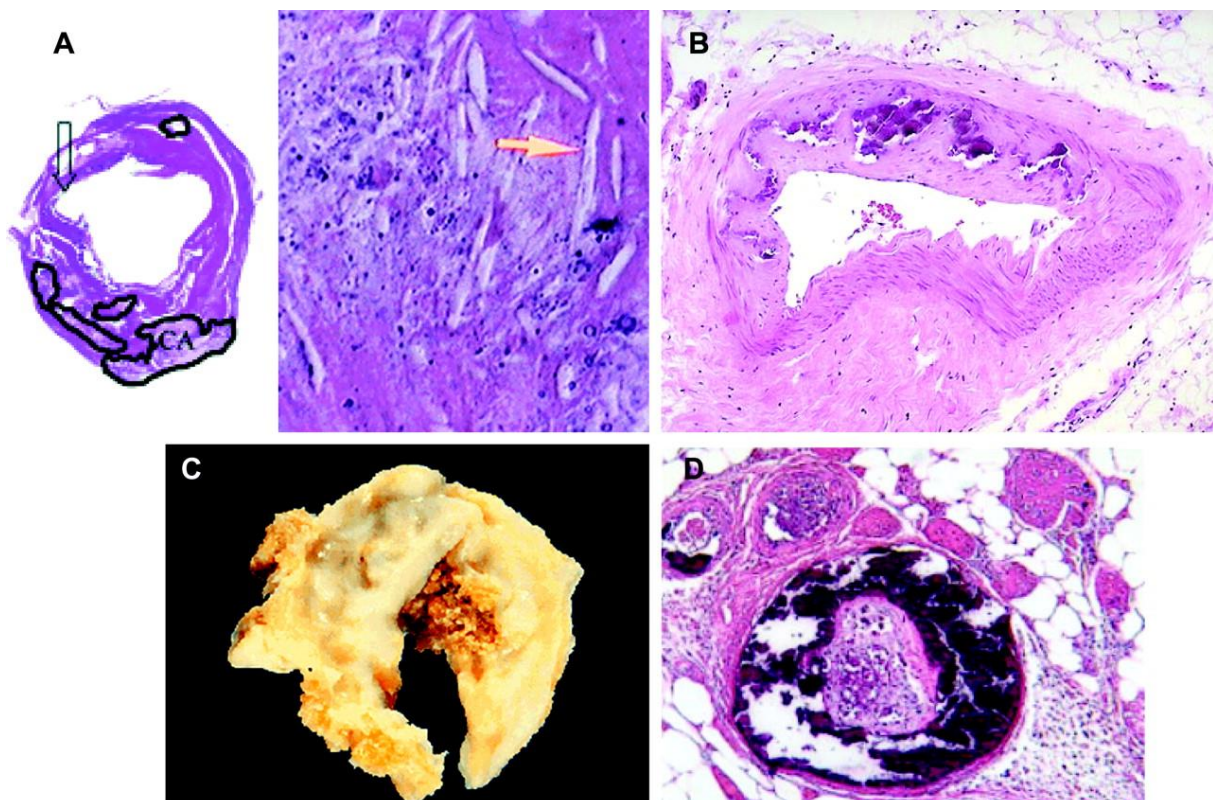


Figure 15. Différents types de calcifications vasculaires. A, calcification d'une plaque athérosclérotique rompue; les zones de calcification sont indiquées. Les cristaux de cholestérol sont indiqués par la flèche. Les sphères bleues représentent les microcalcifications; B, calcification médiale, compatible avec la sclérose de Mönckeberg; C, calcification valvulaire. Cette valvule aortique bicuspidée sténosée excisée est largement calcifiée; D, calcification artérielle.

calcifiée ; D, Calciphylaxie. Une calcification interne étendue est observée dans ce vaisseau sous-cutané isolé de la cuisse d'un patient atteint de calciphylaxie [181].

1.3.1.1 Calcifications intimes au cours de l'athérosclérose

La calcification intinale athérosclérotique est la forme la plus fréquente de vasculopathie calcifiée. Elle semble notamment résulter de la différenciation ostéogénique de sous-populations de cellules vasculaires ou de progéniteurs par des facteurs inflammatoires, tels que les lipoprotéines modifiées et les cytokines, présentes dans les composants athéromateux de la plaque. La plupart des études cliniques relie la dyslipidémie à la présence, à la sévérité et à la progression des calcifications vasculaires [182–184]. Étant donné la pertinence de la durée d'exposition, l'association peut être masquée dans des études transversales qui incluent des patients avec des traitements hypolipémiants comme les statines qui ne reflètent pas le niveau d'exposition au cours des décennies antérieures. Les inhibiteurs de la HMG-CoA réductase (statines) réduisent *in vitro* la calcification des cellules vasculaires par la voie de signalisation Gas-6 / Axl53 [185] et, dans certaines études cliniques, ils réduisent la progression de la calcification athéromateuse [186,187]. Cependant, dans les années 2000, les essais randomisés sur les statines n'ont pas mis en évidence de régression des calcifications des plaques [188,189]. Les effets pleiotropiques des statines rendent les interprétations difficiles quant aux mécanismes impliqués.

Les stimuli athérogènes, tels que les cytokines inflammatoires, les lipides oxydés et les substances sécrétées par les lignées monocytaires-macrophages, favorisent l'ostéogenèse et la calcification de la matrice lors des cultures de cellules vasculaires [190–193]. Un taux élevé de glucose active également les programmes ostéogéniques, reflétés dans l'expression de l'ALP dépendante de Runx2 / Cbfa1 [194]. La différenciation ostéoblastique des cellules vasculaires est notamment régulée par la voie cAMP, Msx-2 et la voie de signalisation Wnt [195–197]. Le stress oxydant active ces voies [198] et des facteurs antioxydants, tels que les acides gras oméga-3 et HDL, inhibent la minéralisation des cellules vasculaires *in vitro* [199,200].

1.3.1.2 Calcifications médiales et calciphylaxie

Calcifications médiales

Elles sont caractéristiques de patients atteints de diabète de type II (DT2) [201] et d'insuffisance rénale chronique (IRC) [202]. Les calcifications artérielles de la média (AMC) était autrefois considérée comme bénigne parce qu'elle n'était ni sténotique ni thrombogène, mais elle s'accompagne d'une mortalité cardiovasculaire et d'un risque d'amputation plus élevés dans le DT2 [203,204] et dans l'insuffisance rénale terminale [205]. Il existe de plus en plus de preuves de mécanismes hétérogènes concourant aux calcifications médiales. L'hydroxyapatite est le minéral prédominant dans l'AMC diabétique [176]. Dans le contexte de l'insuffisance rénale, associée à des excès épisodiques de phosphate sérique et de calcium, les processus ostéochondrogéniques dépendent de Runx2 / Cbfa1 [206] figurent en bonne place. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM), CML et pericytes cultivés *in vitro* minéralisent en réponse aux apports de phosphate et on observe cliniquement que l'hyperphosphatémie chez les insuffisants rénaux chroniques favorise les calcifications vasculaires. De plus, le phosphate inorganique contribue à la différenciation ostéogénique des CML vasculaires par l'induction d'un transporteur de phosphate dépendant du sodium (PNAS) et dépendante de l'induction de Runx2 [207]. En outre, Pit-1 est induit par BMP-2 [208] qui réduit également significativement la calcification des CML vasculaire [209].

Au cours du DT2, il a été établi que la signalisation BMP2-Mxs2-Wnt, qui est impliquée dans la différenciation cellulaire et l'ostéogenèse, occupe une place importante dans les premiers stades de la calcification médiale [210] indépendamment de Runx2 / Cbfa1 [211].

La dégradation de l'élastine apparaît tôt dans de nombreuses formes de calcification médiale. Les métabolites de l'élastine peuvent activer et même nucléer les dépôts de calcium pour initier la minéralisation [212–218]. La métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9), une gelatinase/collagenase IV exprimée dans la paroi vasculaire lésée, semble favoriser le dépôt de calcium artériel dans les modèles de calcification médiale à la warfarine [219,220]. Une matrice d'élastine intacte stabilise le phénotype vasculaire des CML *in vivo*, des changements dans l'expression de l'ostéopontine et la dégradation de l'élastine dépendante de MMP9 peuvent contribuer de manière significative à la calcification médiale dans le diabète (Figure 16).

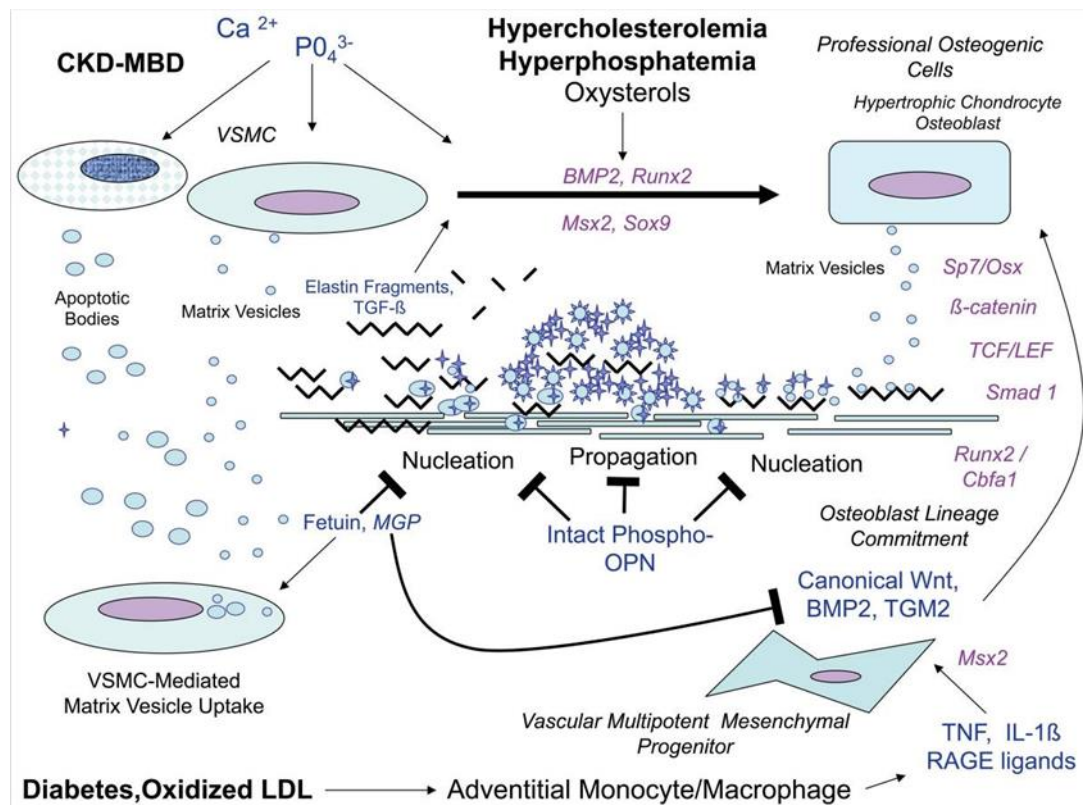


Figure 16: Origine des cellules ostéogéniques vasculaires, fonctions et phénotypes dans la calcification artérielle [221].

Calciphylaxie

La calciphylaxie est une maladie rare, elle est également nommée artériopathie calcifiante et urémique, c'est une microangiopathie thrombosante cutanée qui peut potentiellement menacer la vie des patients. Il s'agit d'un syndrome associant des ulcérations progressives de la peau résultant de l'obstruction des artères de moyen et petit calibre ainsi que de l'occlusion des artérioles calcifiées. Au début, les lésions se présentent sous forme de lésions érythémateuses ou violacées pouvant évoquer un livedo. Elle se manifeste également par des ecchymoses, des indurations nodulaires ou en plaques, érythémateuses ou non, très douloureuses, souvent symétriques, accolées le long du côté interne des membres. Ces lésions progressent généralement vers des ulcérations et des escarres. La douleur est sévère, de type neuropathique.

La formation de lésions de calciphylaxie nécessite deux étapes clés : (1) la calcification médiale et la fibrose intimale des artérioles, et (2) l'occlusion thrombotique due à la calcification progressive et à la dysfonction endothéliale (Figure 17). Le dysfonctionnement des mécanismes régulateurs des niveaux de calcium, de phosphate et d'hormone

parathyroïdienne (PTH) entraîne des calcifications vasculaires. La calciphylaxie est caractérisée par la calcification des milieux vascularisés par des artérioles. En raison de l'association entre la régulation du calcium, du phosphate et la calciphylaxie, il n'est pas surprenant que la majorité des cas de calciphylaxie surviennent chez des patients souffrant d'insuffisance rénale [222]. Le phosphate inorganique peut atteindre des niveaux pathologiques dans les maladies rénales en raison de l'excrétion altérée. Selon le modèle actuellement accepté pour les calcifications vasculaires, la pathogenèse des lésions commence par la transformation des CML vasculaires en phénotype ostéoblastique [223]. Ce processus se fait par interaction entre l'urée-hyperphosphatémie, toxines urémiques, les ROS et la diminution de la protéine gla de la matrice (MGP), puissant inhibiteur de la minéralisation tissulaire. Dans une certaine mesure, la calciphylaxie est toujours influencée par le système rénal, car l'hyperphosphatémie déclenche la transformation des CML vasculaire en un type ostéoblastique [224].

La protéine morphogénétique osseuse 4 (BMP4) et l'ostéopontine sont également exprimées dans des biopsies de patients atteints de calciphylaxie et sont importantes dans la transformation ostéoblastique [225]. L'activité des membres de la famille BMP dans la calcification extrasquelettique dépend des ROS, qui agissent par le biais du facteur nucléaire kappa B (NFkB) pour stimuler le processus de calcification [226]. En variante, NFkB peut être régulée à la hausse par la perte d'inhibiteurs constitutifs, tels que l'ostéoprotégérine (OPG).

Cependant, la calcification médiale et la fibrose sous-intimale des artérioles seules ne sont probablement pas suffisantes pour provoquer la calciphylaxie. Le rôle de l'hypercoagulabilité dans le développement de la calciphylaxie est majeur. Jusqu'à 38% et 43% des cas rapportés présentent une diminution des taux de protéines C et S, respectivement [227]. Le rôle de l'hypercoagulabilité dans la calciphylaxie est confirmée par des résultats histopathologiques démontrant une thrombose chez 38 des 44 patients (86%) d'une cohorte, sans infiltrats inflammatoires évocateurs d'un processus vascularitique [228].

Il existe une hypercoagulabilité locale avec l'expression de cytokines inflammatoires, notamment le $\text{TNF}\alpha$, l' $\text{IL1}\beta$ et l' IL6 , peuvent réduire les réponses antithrombotiques par l'expression des récepteurs aux protéines C et S en limitant l'action des inhibiteurs, mais aussi par l'expression de la thrombomoduline qui favorise directement le processus thrombotique [229].

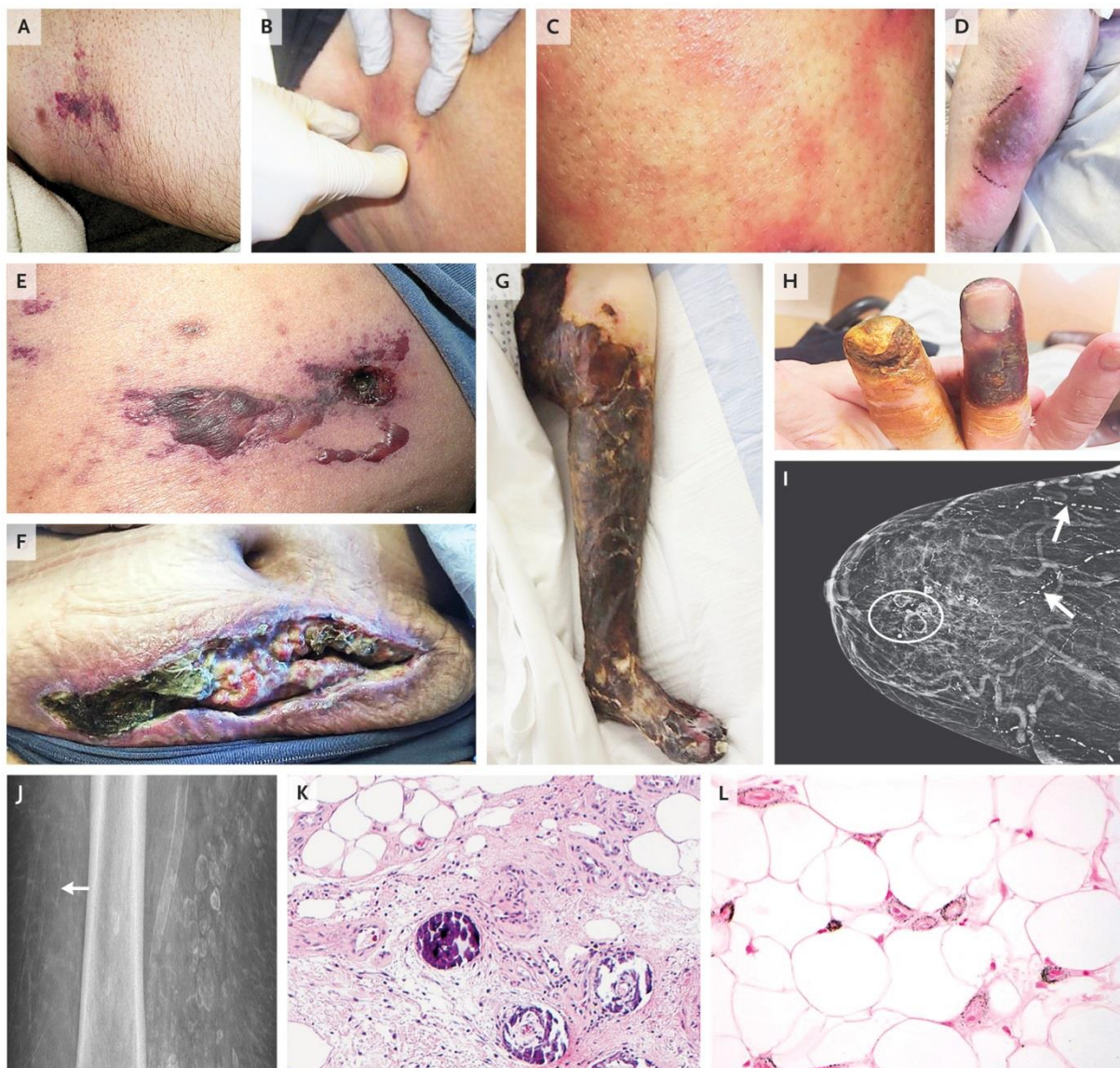


Figure 17: Manifestations de la calciphylaxie: patch violacé avec purpura rétifforme (A), nodule sous-cutané palpable avec érythème (B), motif réticulé d'érythème (C), induration trouble pigmentaire (D), et plaques avec livedo (E) ; F, G et H manifestations tardives: un ulcère nécrotique partiellement recouvert d'une escarre (F), une jambe avec une apparence momifiée (G) et des nécroses digitales (H) ; I, une mammographie d'un patient atteint de calciphylaxie du sein montre des calcifications microvasculaires (flèches) et une nécrose graisseuse (ovale) ; J, des calcifications microvasculaires en réseau (flèche), des calcifications sous-cutanées extravasculaires et une artère fémorale calcifiée sont visibles sur une radiographie d'un patient atteint de calciphylaxie ulcéreuse de la cuisse. Une coupe de biopsie cutanée (K) montre une calcification basophile grossière, une hyperplasie fibro-intimale et un thrombus de fibrine dans des microvaisseaux dermiques et sous-cutanés avec panniculite septale. Une section de biopsie cutanée (L) montre de fines calcifications artériolaires et interstitielles [230].

1.3.1.3 Calcifications valvulaires aortiques

La calcification de la valve aortique (CAVD) est caractérisée par un épaissement global de la cuspide valvulaire et la présence de nodules riches en calcium sur la surface de la valve aortique et / ou dans la région annulaire, conduisant à une raideur fonctionnelle et à une sténose [231]. La CAVD est lente et progressive, les stades précoces sont associés au dysfonctionnement endothélial comme le stress oxydatif suite à l'exposition à des facteurs de risque connus (vieillessement, taux élevés de LDL) [232–234], et l'inflammation conduisant à l'infiltration de cellules immunitaires comprenant des lymphocytes T et macrophages [235,236]. Ce recrutement cellulaire pourrait être le résultat d'un dysfonctionnement endothélial et de l'absence de barrière physique entre la cuspide interne et le sang circulant. Collectivement, ces anomalies et probablement d'autres mécanismes actuellement inconnus déclenchent des processus pro-ostéogéniques.

1.3.2 Calcifications artérielles et risque cardiovasculaire

Dans les sociétés occidentales, les artères sont le deuxième tissu le plus fréquemment calcifié après le squelette [178,221]. La minéralisation artérielle a de lourdes conséquences : elle augmente la charge de travail myocardique, diminue la perfusion diastolique et réduit la perfusion viscérale, augmentant ainsi le risque d'accident vasculaire cérébral, de démence, d'infarctus du myocarde, d'insuffisance cardiaque, d'insuffisance rénale, et l'amputation des membres inférieurs [178,204,221,237–241]. Au niveau des plaques, comme cité précédemment, elle favorise la rupture et la formation de thrombus, et impact négativement l'efficacité des traitements endovasculaires.

Actuellement, il n'existe aucune pharmacothérapie efficace pour réduire la calcification artérielle et restaurer la compliance des vaisseaux sanguins. Le vieillissement est fortement associé à la calcification vasculaire [242,243], son incidence peut augmenter de 30% en fonction de l'âge (20 vs 90 ans) [244]. Les calcifications vasculaires peuvent se produire dans tout le système vasculaire, bien que les estimations de prévalence varient [242,245]. Dans une cohorte de patients asymptomatiques (n = 650), 61% des patients présentaient une calcification athérosclérotique de l'aorte, des carotides, des coronaires, ou dans les lits vasculaires iliaques [246]. Pour l'évaluation de l'athérosclérose, la quantification du calcium artériel coronaire (CAC) identifié par scanner s'est avéré être un puissant prédicteur de l'infarctus du myocarde [247,248]. Les scores calciques améliorent la prédiction du risque

lorsqu'il est ajouté au score de risque de Framingham. De plus, la progression des scores calciques au cours du temps est significativement associée à la coronaropathie incidente et à la mortalité [249,250]. Par ailleurs, Le risque de calcification vasculaire est plus élevé chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) que chez les individus en bonne santé [251]. Des études épidémiologiques de patients atteints d'IRC ont rapporté une incidence des calcifications vasculaire de 30% et 50% dans les groupes d'âge de 15-30 et 40-50 ans, respectivement [252]. Les calcifications vasculaires sont fréquemment observées chez les patients dialysés, où elle peut se produire dans les couches intima et média des vaisseaux sanguins et dans les valves cardiaques. La prévalence de la calcification des artères coronaires est élevée chez les patients dialysés ; un certain degré de calcification des artères coronaires est observé chez 54% à 100% des patients, bien au-dessus de la prévalence dans la population générale [253]. De même, chez les patients présentant une artérite oblitérante des membres inférieurs (AOMI) proximale nécessitant une prise en charge chirurgicale, les lésions présentent souvent des calcifications intimes [254].

1.3.3 Aspects histologiques des calcifications intimes (ou athérosclérotiques)

Différents types de calcifications sont rencontrés dans les plaques athérosclérotiques (Figure 18) :

- micro-calcifications/centre clair
- calcifications en feuillet (sheet-like calcifications),
- calcifications nodulaires,
- métaplasie ostéoïde.

Les microcalcifications / calcifications à centre clair, représentent les microparticules de calcium, et des structures ressemblant à de petites vésicules de l'ordre de 20 μm . Les calcifications en feuillet ou en strate sont définies comme un front de calcification au sein de tissu fibreux entouré par de nombreuses microparticules calcifiées. Les calcifications nodulaires sont des structures minéralisées rondoïdes de 20 à plusieurs centaines de micromètres. Le dernier type de calcifications est la métaplasie ostéoïde [254].

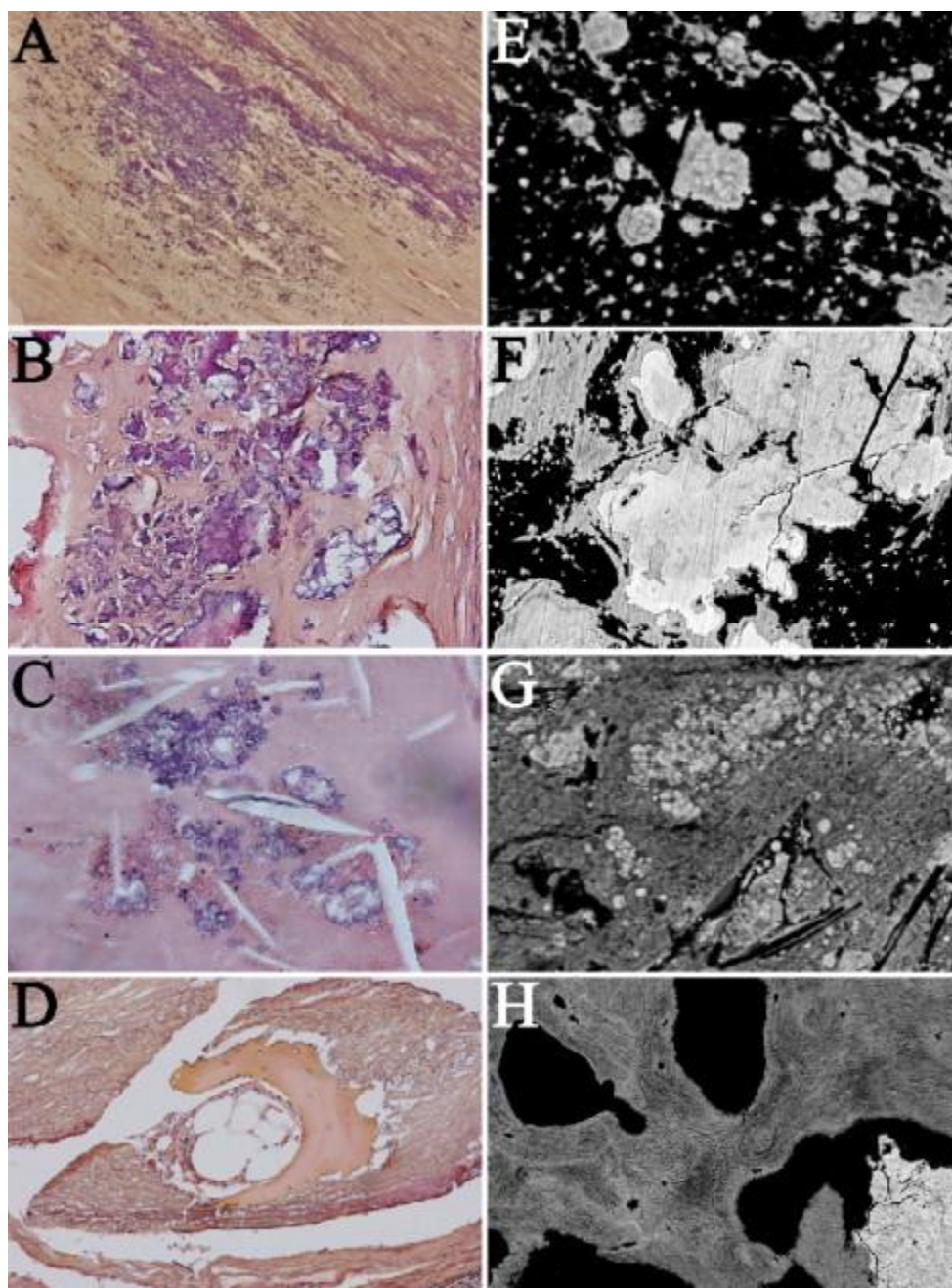


Figure 18: Coloration de l'hématoxyline-éosine et du safran et microscopie électronique à balayage images électroniques rétrodiffusées ; (A) calcifications en feuille ; (B) calcifications nodulaires ; (C) microcalcifications/centre clair ; (D) métaplasie ostéoïde. (E) calcifications en feuille (F), calcifications nodulaires (G) microcalcifications (H) métaplasie ostéoïde [254].

Un tissu osseux typique peut être rencontré dans les plaques artérielles, avec une incidence pouvant aller jusqu'à 65% des plaques au niveau des artères fémorales (Figure 19). Cette métaplasie ostéoïde est composée d'une matrice extracellulaire multilamellaire dense constituée de collagène dans lequel sont enchâssés des cellules ostéocytaires. Des structures lipidiques et vasculaires ayant une grande ressemblance avec la moelle osseuse sont également notées dans le voisinage immédiat de ces métaplasies ostéoïde. On retrouve des cellules géantes multinucléées semblables aux ostéoclastes qui se situent en périphérie de la métaplasie ostéoïde et des tissus minéralisés. Ces cellules expriment l'enzyme TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase), confirmant leur activité ostéoclastique.

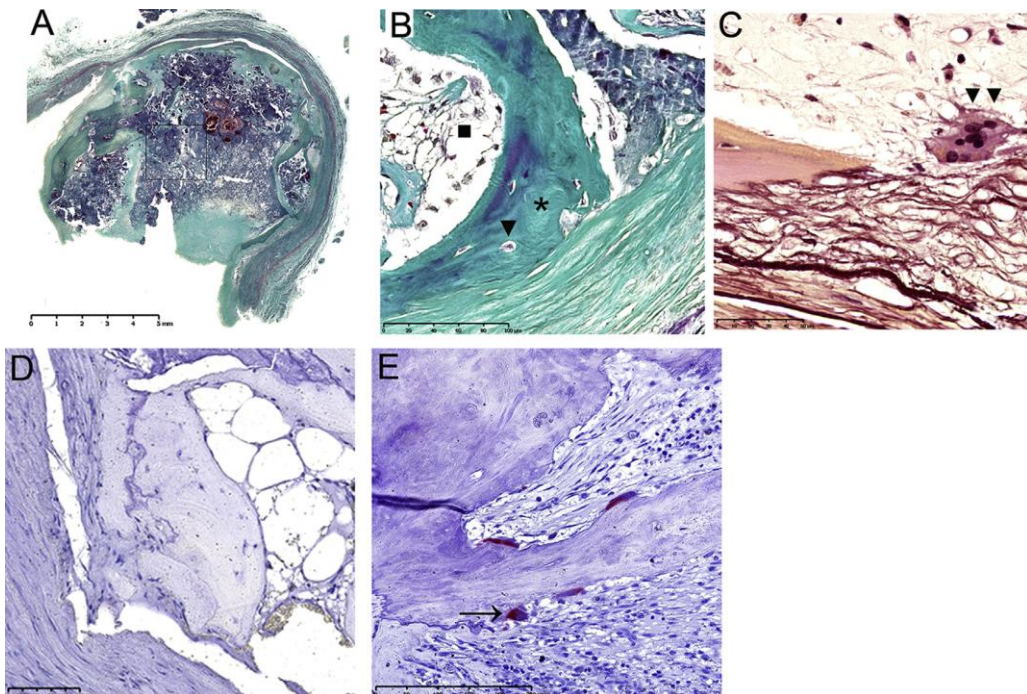


Figure 19: (A) Coupe représentative d'une lésion de l'artère fémorale calcifiée. (B) grossissement de la zone de métaplasie ostéoïde (OM) avec une matrice extracellulaire dense (*), des ostéocytes (▼) et de la moelle osseuse (■). (C) grossissement d'une lésion mettant en évidence d'ostéoclaste comme une cellule géante multi-nucléée (■■), au voisinage de OM. (D) Coupe représentative des lésions fémorales avec OM montrant l'absence de coloration de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) p. (E) Section représentative de la coloration positive TRAP.

1.3.5 Mécanismes de calcification et d'ostéogenèse dans l'athérosclérose

1.3.5.1 Vésicules matricielles et calcification

Les vésicules matricielles sont de petites particules sphériques (50-200 nm) denses en microscopie électronique caractérisées par la présence de calcium et de phosphate inorganique (Pi), de phosphatase alcaline (PAL) et d'annexines. Des vésicules matricielles ont été identifiées dans toutes les formes de minéralisation dans les tissus humains, y compris dans l'os, le cartilage, le tendon, la calciphylaxie et l'athérosclérose. Dans le compartiment osseux, elles jouent un rôle clé dans l'ostéogenèse en permettant la nucléation du calcium et phosphate, pour former les cristaux d'hydroxyapatite qui initient le processus de minéralisation de la matrice extracellulaire. Les vésicules matricielles sont également impliquées dans la promotion de la calcification médiée par les CML vasculaire [255,256]. Les CML vasculaires incubées avec des concentrations élevées de calcium et de Pi libèrent des vésicules matricielles dans les milieux de culture. La présence de la fétuine-A (AHSG ou glycoprotéine α -2-Herremann-Schmid), un inhibiteur circulant de la minéralisation, diminue l'accumulation de calcium des vésicules matricielles [257]. Deux types de vésicules matricielles produites par des CML vasculaires ont été rapportées *in vitro* : une forme sécrétée riche en fétuine-A et faible en annexine II et ne pouvant minéraliser le collagène de type I, et une forme de vésicules matricielles présentant une faible quantité de fétuine-A et une forte quantité d'annexine II pouvant minéraliser le collagène [258]. Ces résultats suggèrent que la régulation du trafic membranaire et du contenu des vésicules matricielles peut réguler les capacités de minéralisation de ces cellules.

1.3.5.2 Processus d'ostéogenèse

L'ostéogenèse, ou formation du tissu osseux, est un processus au cours duquel un tissu conjonctif est transformé en tissu osseux. La vascularisation du tissu conjonctif en transformation est une condition nécessaire au déroulement des différents processus d'ossification qui se passe en deux grandes phases : l'ossification primaire et l'ossification secondaire. Au cours de la pathologie athéroscléreuse, on retrouve de nombreuses lésions artérielles calcifiées mais comme cité préalablement, il existe également d'authentiques processus d'ostéogenèse au sein de la paroi artérielle. Les principaux mécanismes contribuant à cette ossification sont représentés dans la figure 20. Il existe une communication entre différents tissus qui participent au processus de calcification et d'ossification artérielle, en effet, par l'intermédiaire de radicaux libres, du VEGF, il y a des échanges entre artères, tissu osseux et adipeux. On observe également des processus faisant intervenir des facteurs de croissance des fibroblastes avec l'intervention du FGF 23 et du FGF récepteurs 1 qui impliquent le système rénal qui amplifie les processus de calcification [259].

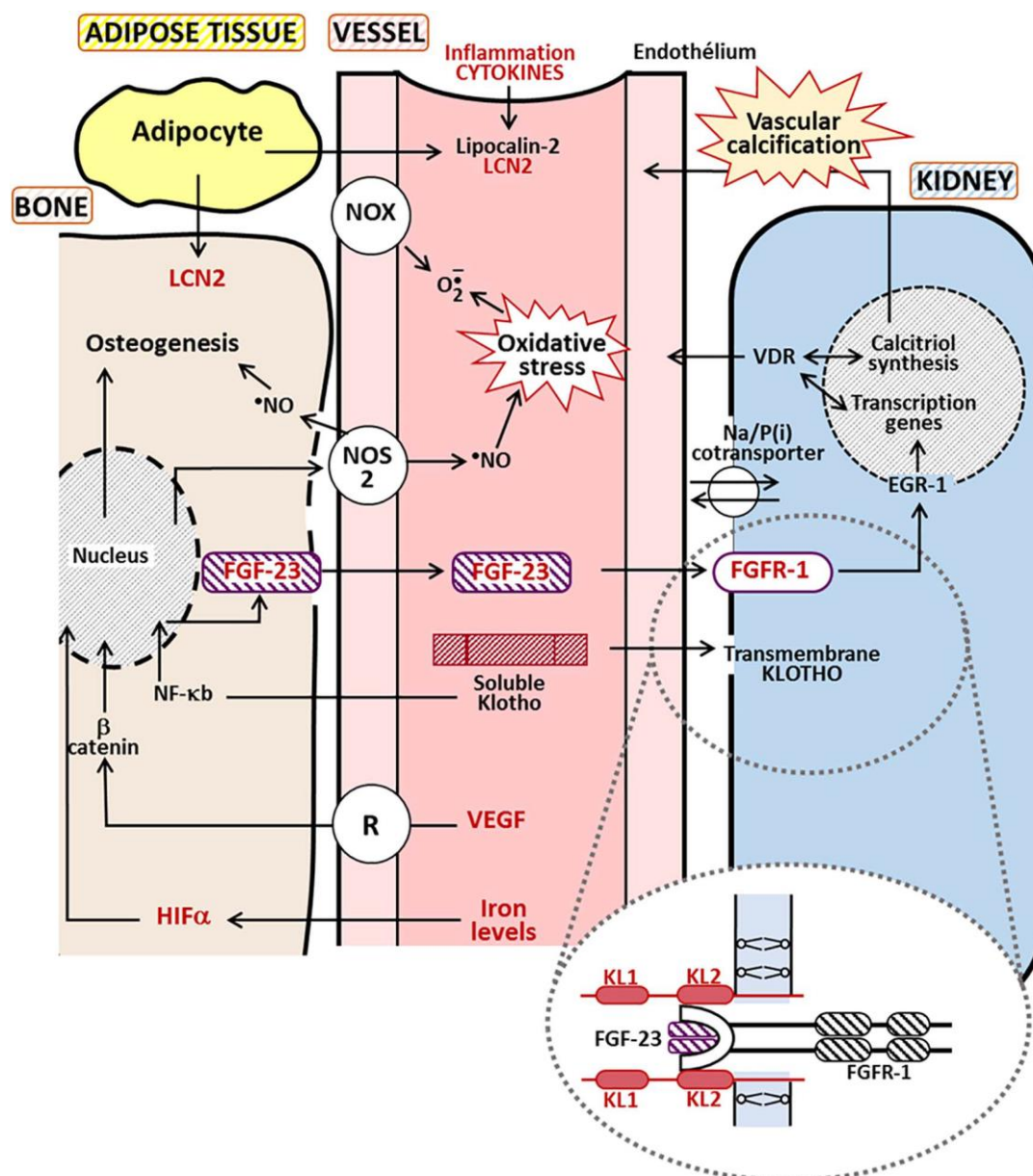


Figure 20 : Principales interactions entre différents tissus (tissu adipeux, os, vaisseaux et reins) médiées par l'ostéoprotégérine (OPG), FGF-23, Klotho soluble, VEGF et stress oxydatif, oxyde nitrique (NO), superoxyde et fer. La lipocaline-2 (LCN2) est une adipokine ayant une activité spécifique de liaison aux lipides régule l'homéostasie osseuse. L'oxyde nitrique (NO) produit par NOS-2 dans les ostéocytes et par l'endothélium des vaisseaux intégrés dans l'os est un régulateur important de la réponse osseuse au stress mécanique. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), la bêta-caténine et les facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF) sont impliqués dans l'ostéogenèse et l'angiogenèse. La protéine Klotho membranaire agit comme co-récepteur du facteur de croissance des fibroblastes 23 (FGF-23). Klotho interagit avec les récepteurs du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR-1) pour former une forte affinité pour le FGF-23 [259].

La formation de calcifications ectopiques au niveau artérielle reproduit probablement une ossification enchondrale en faisant appel à des mécanismes de plasticité phénotypique des cellules de la paroi artérielle qui agissent comme des précurseurs mésenchymateux. Ce type d'ossification membranaire est à distinguer de l'ossification enchondrale, où la formation de tissu osseux est réalisée à partir de cartilage néoformé. Il n'est pas exclu que de réels

progéniteurs mésenchymateux recrutés sur ces plaques puissent également participer à cette ossification. Ces processus de calcification et d'ossification font intervenir de nombreux acteurs dont les facteurs de transcription ostéochondrogénique, des mécanismes inflammatoires, les bone morphogenic protéine (BMP) et un certain nombre d'inhibiteurs comme la fétuine-A, Matrix Gamma-Carboxyglutamate, le pyrophosphate. Dans les maladies artérielles périphériques, on observe la présence de microcalcifications/centres clairs qui sont particulièrement rencontrées dans des plaques inflammatoires et lipidiques. Une hypothèse pour expliquer leur présence est que les processus inflammatoires favorisent la formation et le « dépôt » de vésicules matricielles qui initient le processus de calcification de la plaque [260].

1.3.5.3 Cellules intervenant dans les processus de calcifications artérielles

- Cellules musculaires lisses vasculaires

Les CML sont des cellules musculaires non-striées, contractiles, non-volontaires. Elles sont d'origine mésenchymateuses, comme les péricytes et ostéoblastes. En fonction du territoire artériel et des contraintes locales, les CML peuvent acquérir des phénotypes spécifiques au cours de l'embryogenèse dès la 15^e semaine de développement [261]. Ces cellules sont présentes dans divers types de tissus, y compris les vaisseaux sanguins, la trachée, et le tube digestif. Le muscle lisse est essentiel au fonctionnement optimal des vaisseaux sanguins, principalement pour le maintien de la pression artérielle par la contraction et la relaxation de la média [262]. Les CML vasculaires jouent également un rôle essentiel dans l'activation et le remodelage de la matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins [263]. Elles ont des origines embryologiques différentes en fonction du territoire artériel auquel elles appartiennent, crête neurale pour les CML des carotides de l'aorte thoracique, mésoderme splanchnique pour les CML de l'aorte abdominale et les axes iliofémoraux [264].

Dans les tissus adultes normaux, les CML ont un phénotype contractile. Ils prolifèrent lentement, répondent à des médiateurs vasoactifs tels que l'acétylcholine et la norépinéphrine et expriment une gamme de protéines contractiles, α -smooth muscle actin (α SMA), SM22 α , SM chaînes lourdes de myosine SM1 et SM2, calponine et smoothelin. Cependant, contrairement aux autres myocytes, les CML vasculaires ne sont pas différenciées en phase terminale et présentent une plasticité phénotypique [265].

Les CML vasculaires peuvent modifier leur phénotype en réponse à des signaux locaux, directs ou indirects par l'intermédiaire des cellules endothéliales, et sont capables en particulier de perdre leur capacité contractile tout en augmentant leur prolifération, leur migration, et leur production de matrice extracellulaire. Ce phénotype de type « myofibroblastique » est retrouvé dans différents cadres pathologiques vasculaires en réponse à d'importants stress aigus ou chroniques (lésion, hypoxie, inflammation chronique...).

Les CML sont capables d'acquérir tout un spectre de phénotypes et peuvent présenter des caractéristiques d'ostéoblastes, de chondrocytes, d'adipocytes et de cellules phagocytaires (Figure 21). Le passage d'un phénotype contractile à un phénotype ostéo / chondrogénique est caractérisé par la baisse d'expression des molécules inhibitrices de la minéralisation et l'élaboration d'une matrice propice à la calcification [266]. Ce phénotype s'accompagne d'une perte de marqueurs contractiles des SMC ($\text{SM22}\alpha$ et α SMA) et le gain de marqueurs ostéochondrogéniques (Runx2, SP7, ostéopontine, ostéocalcine et phosphatase alcaline (ALP), Sox9, Type II et X collagène (Col II et Col X)). Alors que cette plasticité des CML vasculaires est bien documentée et largement reconnue, leur rôle précis dans la calcification athéromateuse chez l'homme reste encore sujet à discussions. D'autres types cellulaires, tels que les progéniteurs circulants, les cellules souches vasculaires ou mésenchymateuses multipotentes, les cellules adipeuses, les fibroblastes et les macrophages peuvent se différencier et exprimer des marqueurs des CML vasculaires [267]. Près de 40% des cellules spumeuses expriment à la fois le marqueur des CML α SMA-2 et le marqueur macrophagique CD68, bien qu'il ne soit pas clair si ceux-ci représentent des cellules dérivées de CML vasculaires qui ont des marqueurs macrophages activés, ou sont des macrophages qui ont des marqueurs CML activés.

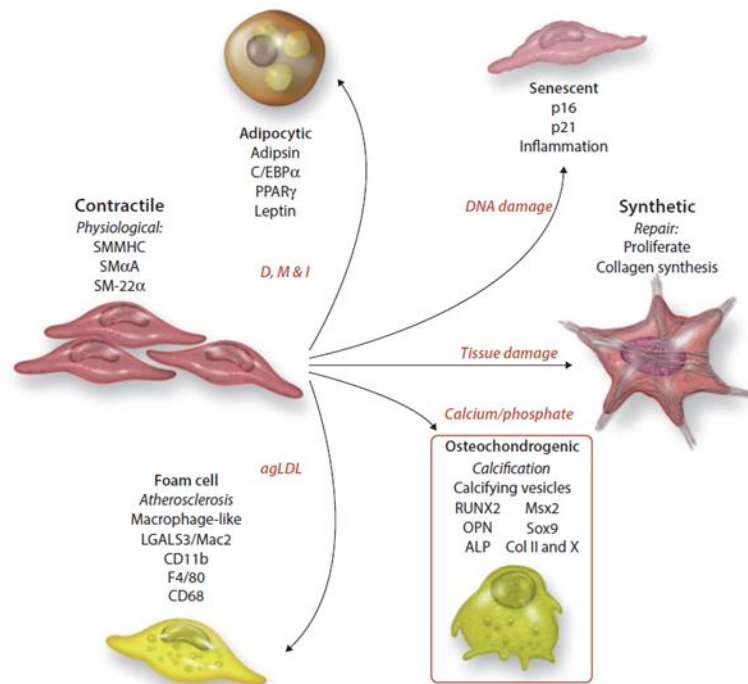


Figure 21 : Principaux phénotypes CML v et de leur origine cellulaire au cours des calcifications vasculaires. Représentation schématique du spectre des phénotypes des CML vasculaire identifiées lors des calcifications vasculaires (en gras), de leurs marqueurs cellulaires et des facteurs phénotypiques en rouge. (Dexaméthasone (D), méthylisobutylxanthine (M) et insuline (I)) [268].

La plasticité phénotypique des CML vasculaires en réponse à des stimuli de stress dans le microenvironnement local, favorise le changement des CML vasculaires vers un phénotype ostéochondrogène avec le développement calcifications artérielles intimes. Des analyses histologiques détaillées de la taille et de la localisation des calcifications athérosclérotiques coronariennes humaines ont impliqué les CML vasculaires en tant qu'organiseurs cellulaires majeurs. Les microcalcifications, typiquement des particules de <15 μ m, sont fréquemment observées dans la chape fibreuse, tandis que des macrocalcifications sont souvent trouvées dans l'intima profonde, adjacente aux membranes lamellaires et aux tuniques élastiques internes, toutes les régions riches en CML vasculaires [269,270]. La différenciation chondrocytaire (Runx2, BMP2, Msx2, osterix et Sox9) est associée à la calcification au cours de l'athérosclérose [271,272]. Les cellules aux propriétés ostéoblastiques et / ou chondrocytaires co-localisent souvent avec les dépôts de calcium-phosphate dans les lésions athéromateuses [269,271,273]. La différenciation ostéochondrogénique des CML vasculaires au cours de la calcification athéromateuse a été démontré dans des études expérimentales avec de modèles murins d'athérosclérose [274,275]. Ces études ont révélé que la majorité des

cellules précurseurs ostéochondrogéniques (75-88%) et presque toutes les cellules ressemblant aux chondrocytes (~ 98%) observées dans les lésions athérosclérotiques étaient dérivées des CML vasculaire [274].

Au cours de l'embryogenèse squelettique, non seulement les chondrocytes et les ostéoblastes, mais aussi les CML se développent à partir de cellules précurseurs mésenchymateuses multipotentes, et l'orientation phénotypique dans laquelle elles sont guidées dépend des voies moléculaires activées par de nombreux facteurs paracrines et autocrines.

La figure 22 place les différents acteurs cellulaires intervenant au cours de la calcification artérielle.

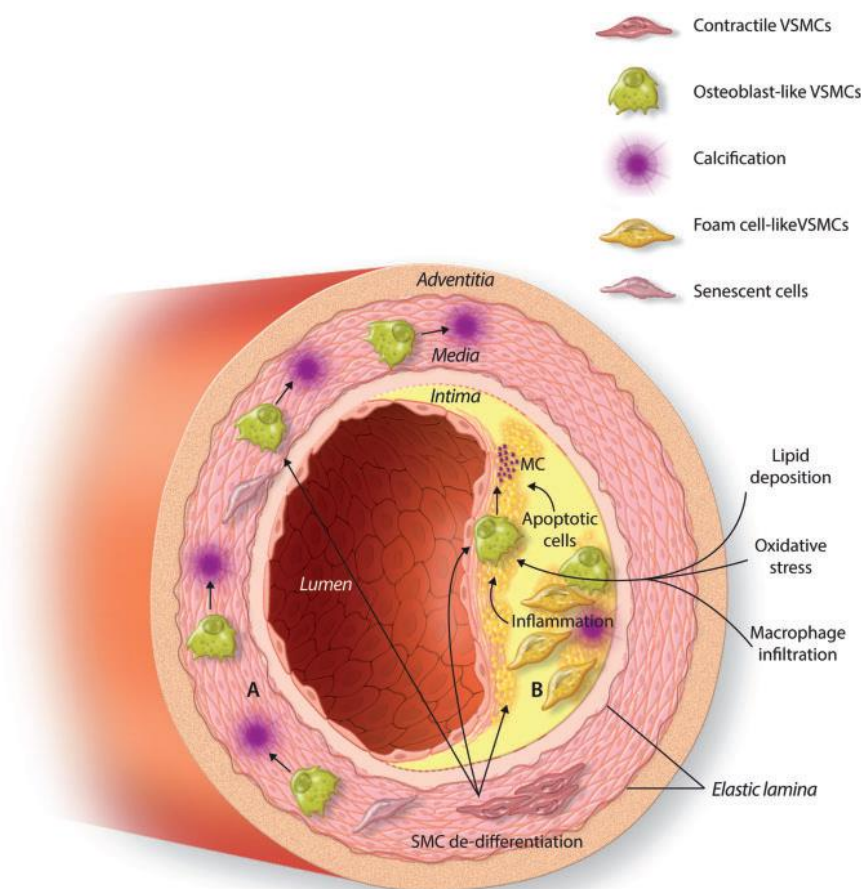


Figure 22: Différenciation des CML vasculaire au cours des calcifications intimales et médiales. (A) Dans la couche médiale, les CML vasculaire répondent à des stimuli ostéogéniques et se différencient en cellules ressemblant aux ostéoblastes. Ceux-ci produisent ensuite des dépôts de macrocalcification dans la couche médiane du vaisseau sanguin provoquant un raidissement de la paroi du vaisseau. (B) L'athérosclérose est caractérisée par un dépôt de lipides entre les couches intima et médiale, ce qui conduit par la suite à l'infiltration des macrophages, ainsi que la différenciation des CML vasculaire en cellules spumeuses. L'inflammation, l'apoptose et le stress oxydatif favorisent ensuite la différenciation des CML vasculaire en cellules ressemblant aux ostéoblastes qui, à leur tour, entraînent des dépôts de microcalcification dans la paroi intima, affaiblissant la structure de la paroi et augmentant le risque de rupture de la plaque [268].

- **Péricytes**

Les péricytes sont des cellules périendothéliales principalement retrouvées au niveau des microvaisseaux qui ont des propriétés contractiles. Tout comme les CML vasculaires, les péricytes ont une origine mésenchymateuse mais ils peuvent avoir des origines embryologiques différentes selon les territoires artériels. Pour les vaisseaux axiaux, ils dérivent du mésoderme, ou du mésoderme splanchnique pour les vaisseaux coronariens. La crête neurale est à l'origine des péricytes et des CML vasculaires qui sont présentes autour de chaque vaisseau dérivé de l'arche aortique [276,277]. Les péricytes présentent des similitudes importantes avec les CML par leur propriété contractile et des caractéristiques communes avec les fibroblastes par leur propriété de synthèse [278,279]. Les péricytes sont retrouvés au niveau de la paroi artérielle des vaisseaux de petits, moyens et gros calibre ; ils forment un réseau continu subendothélial [280]. On les retrouve également au niveau de la partie externe de la média et dans les vasa vasorum de l'adventice. Les péricytes sont impliqués dans la coordination des réponses entre les différents types cellulaires (CML, cellules endothéliales, monocytes/macrophages). Les péricytes ont été identifiés dans les plaques calcifiées [281]. Ils ont la capacité *in vivo* et *in vitro* de se différencier en cellules de type ostéoblastique et de minéraliser [282]. De plus, les péricytes sont des cellules pluripotentes capable de se différencier en ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes, CML ou fibroblastes [283,284] . Il a été montré dans un modèle cellulaire bovin de calcification aortiques que les péricytes forment un nodule qui initie la minéralisation en modulant l'activité de MGP et BMP-2 [285].

- **Cellules souches mésenchymateuses (MSC)**

Les cellules souches mésenchymateuses sont retrouvées dans le sang circulant, elles sont également retrouvées dans de nombreux autres tissus comme la moelle osseuse, le tissu adipeux, le tissu pulmonaire ou cardiaque [286]; toutes cellules mésenchymateuses ont un fort potentiel de différenciation cellulaire. Les CSM d'origine myéloïde peuvent se différencier en ostéoblastes, CML vasculaire et péricytes, et pourraient donc également jouer un rôle dans l'ossification vasculaire. Le recrutement de ces cellules ou progéniteurs mésenchymateux par la circulation, ou par la pseudo-moëlle osseuse souvent observée avant l'apparition du tissu ostéoïde dans les plaques, pourrait contribuer à la présence des cellules ostéoblastiques dans les lésions ossifiées. Runx2 joue un rôle critique dans la différenciation ostéoblastique et la maturation des chondrocytes au cours de la calcification vasculaire induite par l'athérosclérose [287].

- **Ostéoblastes, chondrocytes, ostéoclastes**

Des cellules de type chondrocytaire sont détectées dans la paroi vasculaire, identifiées par l'expression de marqueurs spécifiques tels que sox9, les collagènes II et X. Ces cellules ressemblent morphologiquement à des chondrocytes hypertrophiques de la plaque de croissance osseuse, et sont incorporées dans le tissu cartilagineux qui commence à se calcifier pour former de l'os. Bien qu'il existe des parallèles avec la formation osseuse endochondrale, les chondrocytes et le cartilage ne sont pas systématiquement retrouvés dans les artères calcifiées, suggérant que la calcification directe du tissu vasculaire en tissu osseux, comme cela se produit lors de la formation osseuse intramembranaire, peut également se dérouler pendant la calcification artérielle. La structure de la partie minérale dans la paroi vasculaire est principalement identifiée comme de l'hydroxyapatite, identique au composé minéral présent dans l'os, ce qui confirme que la calcification vasculaire n'est pas seulement un dépôt passif de phosphate de calcium amorphe mais plutôt un processus cellulaire et moléculaire où des cellules semblables à des ostéoblastes et des cellules de type chondrocyte sont impliquées dans la formation de cristaux d'apatite. Dans les plaques athéroscléreuses calcifiées, une partie des cellules de type chondrocyte, exprimant SOX 9, exprime également α -SMA, indiquant que les CML vasculaires pourraient être à l'origine de ces cellules cartilagineuses et osseuses [272]. Il n'est pas toujours facile de faire la distinction entre la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes dans les artères, car les deux types de cellules partagent plusieurs marqueurs communs comme la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine, l'ostéopontine, l'ostéonectine et la sialoprotéine osseuse [288,289]. Plus important encore, le facteur de transcription runx2 (ou CBFA1), surtout considéré comme un marqueur spécifique de la voie de différenciation des ostéoblastes, est également responsable de la différenciation terminale dans les chondrocytes et est fortement exprimée par les chondrocytes hypertrophiques [288].

1.3.5.4 Acteurs moléculaires des calcifications vasculaires

L'étude des calcifications artérielles a montré que de nombreux acteurs intervenant dans les processus d'ostéogenèse et de calcifications sont également impliqués au cours des calcifications artérielles. Les paragraphes ci-après présentent les principaux acteurs qui participent à la régulation des processus de calcification.

- Fétuin-A

Fétuin-A (ou AHSG) est abondant dans le sérum et est un facteur inhibiteur majeur dans la propension à la calcification [290]. Fétuin-A est produit par le foie. Il est diminué pendant l'inflammation. La Fétuine-A se lie à la fois au calcium et au Pi dans le sérum, formant de petites calciparticules B qui sont ensuite éliminées par le système réticulo-endothélial. Fétuin-A agit comme un système de lutte contre les calcifications pour nettoyer le sang du calcium et du Pi indésirable, et ainsi empêcher la calcification indésirable de la paroi vasculaire sans provoquer de déminéralisation osseuse. La fétuine-A peut altérer la cytotoxicité des particules calcifiantes sur les CML vasculaires humaines [291]. Fétuin-A a été trouvé dans les vésicules matricielles des CML vasculaires, et sa présence rend les vésicules incapables de minéralisation [258,292]. L'inhibition ciblée de la fétuine-A entraîne une calcification diffuse et profonde des tissus mous et une calcification des artérioles du muscle, du rein et du poumon, mais pas de grosses artères [293].

- Matrix Gamma-Carboxyglutamate (gla) Protein (MGP)

La protéine matricielle gamma-carboxyglutamate (gla) (MGP) est une protéine vitamine K-dépendante fortement exprimée dans les artères et les os où elle agit comme un inhibiteur local de la calcification. Les souris knockout *mgp*^{-/-} ont un cartilage excessif dont la minéralisation de la plaque de croissance et la calcification de la média artérielle sont associées à une mortalité précoce [294]. MGP est également présente dans les vésicules matricielles pour empêcher la formation de précipitation de complexe phospho-calcique [255]. La warfarine et / ou la carence nutritionnelle en vitamine K entraînent une sous-carboxylation de la MGP et une altération de la fonction [295]. Les mécanismes exacts par lesquels MGP empêche la calcification ne sont pas complètement compris, mais impliquent probablement l'inhibition de la formation de cristaux de calcium et le blocage de la fonction de BMP2 et -4 [296].

- ENPP-1 et Pyrophosphate (PPi)

L'éconucléotide pyrophosphate / phosphodiesterase I (*enpp-1*) est un gène codant pour un enzyme générant le pyrophosphate qui est lui aussi un puissant inhibiteur de la calcification. Le pyrophosphate est catalysé par la phosphatase alcaline non spécifique tissulaire (TNAP) pour donner du phosphate inorganique qui favorise la formation de cristaux d'apatite. L'activité TNAP est augmentée dans les artères calcifiées chez les animaux urémiques [297] et chez les patients atteints d'IRC au stade 5 [298]. Les taux circulants de pyrophosphate sont diminués chez les patients dialysés [299] et sont négativement associés à la calcification artérielle chez les patients atteints d'IRC [300] (Figure 23). La transplantation d'artères de souris déficientes en ENPP-1 ne se calcifient pas lorsqu'elles sont transplantées chez des animaux ayant des taux de pyrophosphate circulants normaux, ce qui prouve un rôle inhibiteur direct [301].

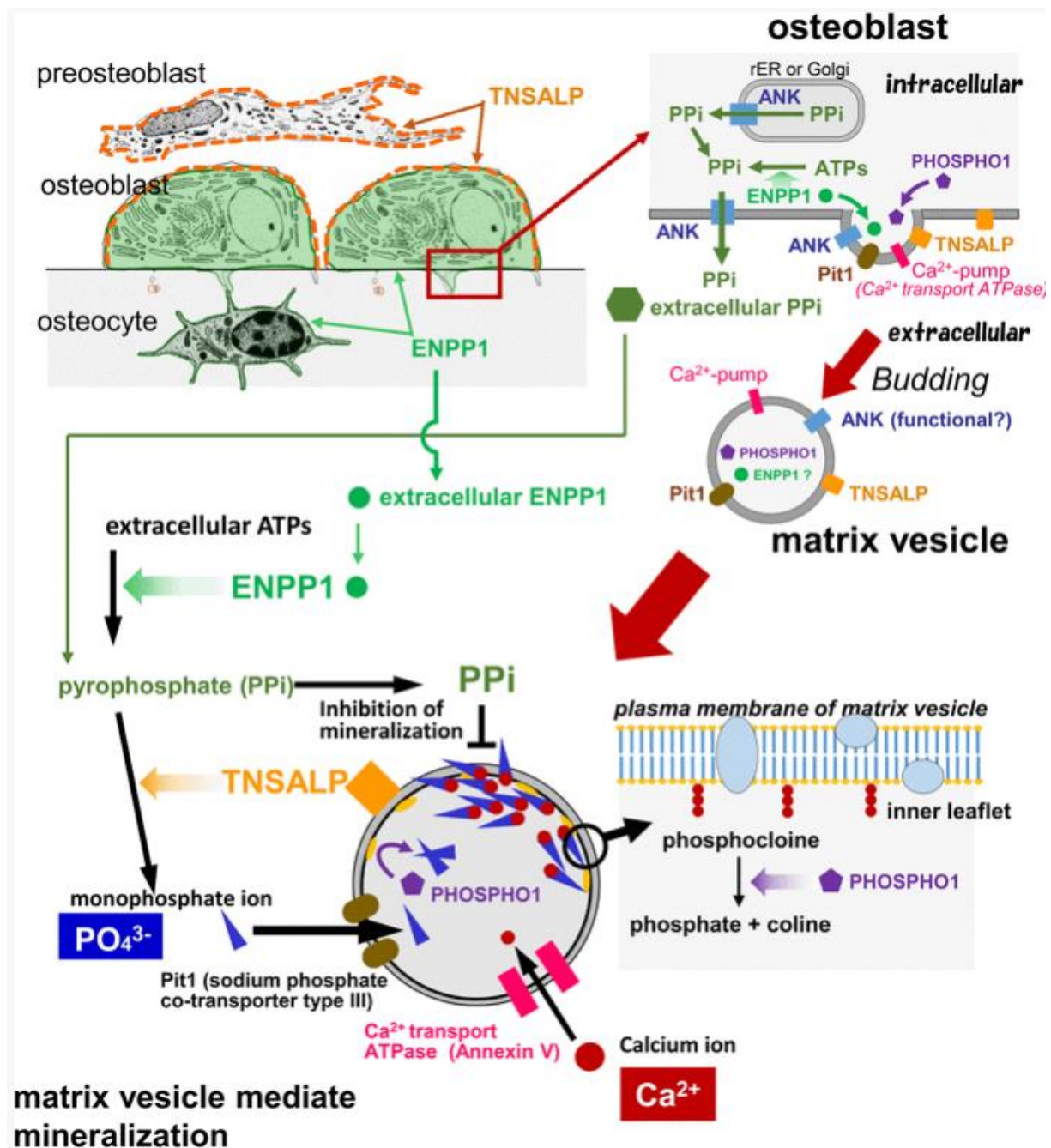


Figure 23: Fonctions biologiques des transporteurs membranaires et des enzymes dans les vésicules matricielles. Les transporteurs membranaires et les enzymes comprenant TNSALP, ENPP1, ANK, PHOSPHO1, le co-transporteur de phosphate de sodium III (Pit1) et l'ATPase de transport de Ca^{2+} dans les vésicules matricielles jouent un rôle pivot dans le transport de Ca^{2+} et PO_4^{3-} dans les vésicules. L'ENPP1 dans les ostéoblastes génère des pyrophosphates inorganiques intracellulaires / extracellulaires (PPi), tandis que l'ANK transporte le PPi intracellulaire à l'extérieur des cellules. Le PPi extracellulaire est hydrolysé par TNSALP pour en monomères PO_4^{3-} , qui sont ensuite transportés à l'intérieur de la vésicule matricielle en passant par Pit1. PHOSPHO1 hydrolyse les phosphocolines des membranes plasmiques des vésicules en colines et phosphates qui sont des constituants des cristaux de phosphate de calcium à l'intérieur des vésicules matricielles. L'ATPase de transport de Ca^{2+} permet l'afflux de Ca^{2+} libre dans les vésicules de la matrice. La phosphatidylsérine de la membrane plasmique a une forte affinité pour produire un complexe phosphate de calcium-phospholipide stable associé au feuillet interne de la membrane de la vésicule. Par la suite, les phosphates de calcium amorphes développent de l'hydroxyapatite pour former des cristaux [302].

- **Bone morphogenic proteins (BMP)**

Les BMP sont des membres de la super famille du TGF β , elles jouent un rôle dans le maintien et la réparation de l'os comme dans d'autres tissus. Leur rôle dans les calcifications vasculaires est complexe. L'évolution phénotypique des CML est notamment régulée par les BMP. En effet, lorsque les CML entrent en phase de prolifération, elles produisent des protéines de la matrice extracellulaire et peuvent devenir des cellules de type ostéoblastiques. La perte des marqueurs musculaires lisses est influencée par les BMP. Les BMP2, BMP4 sont des facteurs de différenciation ostéogénique qui ont la capacité d'induire *in vivo* la formation d'un os ectopique dans le tissu musculaire et participe ainsi à la minéralisation des CML *in vitro*. BMP2 agit notamment par l'augmentation d'expression du facteur de transcription Runx2 [208], et entraîne l'expression et la synthèse de collagène de type I et de la ALP. BMP2 est antagonisée par noggin, chordin et MGP [303]. Par ailleurs, BMP7 favorise la formation du tissu osseux ainsi que le dépôt de phosphate dans les tissus osseux. BMP7 limite l'élévation des taux sériques de phosphate et la formation de calcifications vasculaires [304].

- **Transforming growth factor β (TGF β)**

Ostéogenèse

L'homéostasie osseuse dépend de façon critique des interactions entre les ostéoblastes, les cellules ostéo-formatrices dérivées de l'os, les ostéoclastes et les cellules de résorption osseuse dérivées hématopoïétiquement, dans un processus couplé connu sous le nom de remodelage osseux. Brièvement, le remodelage osseux implique une séquence de recrutement et de différenciation des ostéoclastes, la résorption de la matrice osseuse et une phase d'inversion dans laquelle les ostéoblastes sont recrutés au site de résorption où ils déposent une nouvelle matrice osseuse. Les ostéoblastes finissent par être inclus dans la matrice osseuse sous forme d'ostéocytes matures. Le TGF β est intimement impliqué dans chaque étape de ce processus. Le TGF β régule le recrutement, la différenciation et la fonction à la fois des ostéoblastes (Figure 24) et des ostéoclastes.

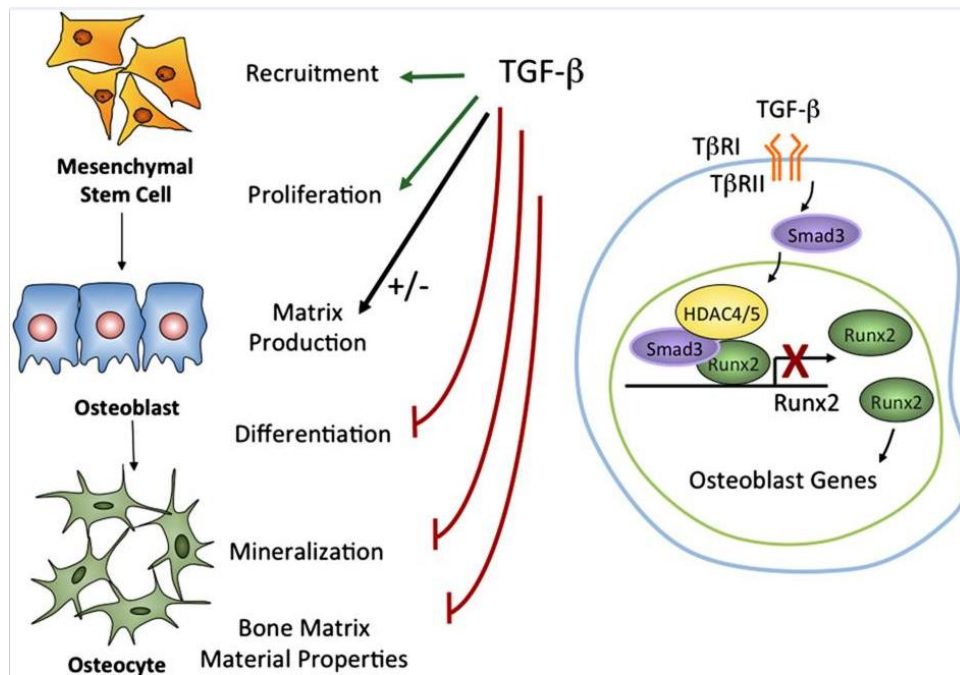


Figure 24: Le TGF β régule le recrutement, la différenciation et la fonction des ostéoblastes. Le Smad3 activé par TGF β réprime la fonction Runx2 pour inhiber la différenciation des ostéoblastes. Cette voie dépendante des ostéoblastes est également responsable de la capacité du TGF β à réguler le module d'élasticité de la matrice osseuse, ou rigidité, et repose sur l'action de Runx2 [305].

Au niveau cellulaire, le TGF β agit sur la lignée des ostéoblastes pour élargir le pool de cellules sécrétant la matrice osseuse. Le TGF β est connu comme chimioattractif pour les cellules ostéoprogénitrices [306]. Le TGF β recrute des ostéoprogéniteurs au site de formation ou de remodelage osseux [307]. Dans les fractures osseuses, les ostéoprogénitrices migrent vers le site de réparation de la fracture, suivant un gradient de TGF β libéré par les plaquettes [308–310]. Le TGF β régule la synthèse de la matrice extracellulaire. Dans un premier temps, le TGF β stimule la synthèse de la matrice osseuse puis le TGF β inhibe la différenciation terminale des ostéoblastes et la synthèse de la matrice osseuse par répression Smad3 de l'expression et de la fonction de Runx2 [311]. Le TGF β agit également sur les ostéocytes différenciés en inhibant l'apoptose des ostéocytes, en partie par un récepteur Smad3 et vitamine D [312]. Par conséquent, le TGF β joue un rôle distinct à chaque étape du cycle de vie des ostéoblastes.

L'effet du TGF β sur les ostéoclastes dépend également du stade de différenciation des ostéoclastes [313]. Le TGF β favorise la chimiotactisme des précurseurs isolés des ostéoclastes dans l'os [314] et stimule la prolifération et la différenciation des précurseurs des ostéoclastes [315–318]. Le TGF β peut agir directement sur les ostéoclastes et leurs précurseurs à travers ses récepteurs TGF β de type I et de type II (TGF β R1, TGF β R2). Cependant, de nombreux effets du TGF β sur les ostéoclastes sont indirects. Par exemple, le TGF β agit sur les

ostéoblastes pour réguler l'expression des protéines régulatrices des ostéoclastes, notamment M-CSF, RANKL, OPG, éphrine B2 et EphB4 [319,320]. À faibles doses, le traitement TGF β améliore l'ostéoclastogenèse en augmentant l'expression du M-CSF. En revanche, des niveaux élevés de TGF β répriment l'expression de M-CSF et de RANKL tout en augmentant l'expression de l'OPG [321–323].

La capacité du TGF β à contrôler les facteurs de régulation des ostéoclastes dérivés des ostéoblastes est l'un des mécanismes par lesquels le TGF β couple la formation osseuse à la résorption [313]. De plus, lors de la résorption osseuse, les ostéoclastes libèrent et activent le TGF β sous forme latente dans la matrice osseuse. Le microenvironnement acide créé par les ostéoclastes active directement le ligand TGF β à partir du complexe latent. Outre la sécrétion de TGF β , les ostéoclastes sécrètent également des métalloprotéases matricielles MMP2 et MMP9 qui, avec la cathepsine K, peuvent activer après protéolyse le TGF β [324–326]. Le TGF β 1 participe à la migration des progéniteurs mésenchymateux dérivés de l'os vers des sites « résorbants » est une étape essentielle du processus de couplage. En induisant le recrutement et la prolifération des ostéoprogéniteurs, le TGF β équilibre la résorption matricielle avec un nouveau dépôt osseux [327,328], une telle structure peut créer un microenvironnement qui limite la diffusion du TGF β et d'autres facteurs de croissance libérés de la matrice osseuse par les ostéoclastes tout en facilitant le recrutement local des progéniteurs.

Différenciation CML et Calcifications vasculaire

De nombreuses études ont montré que la signalisation du TGF β peut moduler les composantes fibrotiques et inflammatoires de la lésion (Figure 25).

Une abondante littérature documente que le TGF β est l'un des principaux acteurs de la différenciation des fibroblastes ou des fibrocytes hématopoïétiques [329] en myofibroblastes [330,331] et pour stimuler la fonction contractile des myofibroblastes [332]. Ainsi, l'effet du TGF β élevé ou dérégulé serait de participer au remodelage pariétal, et intervient également dans la différenciation des CML vers des phénotypes chondrocytaires ou ostéoblastiques. (Figure 25). De nombreuses données suggèrent que les membres de la famille du TGF β , en particulier les BMP, sont des modulateurs importants de la calcification vasculaire [333,334], probablement en créant une matrice extracellulaire pouvant se minéraliser et en favorisant la différenciation ostéoblastique [335].

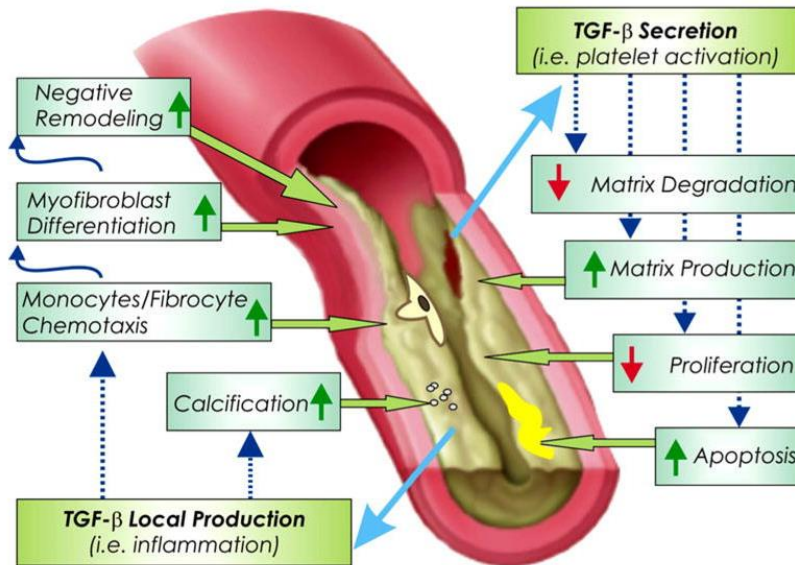


Figure 25: Implication du TGF β dans l'athérosclérose. Une lésion athérosclérotique crée une sténose progressive d'une artère. L'activité de TGF- β peut être générée par la libération de TGF- β actif à partir de plaquettes activées par adhérence à l'endothélium inflammé. Le TGF- β peut également être produit par la plupart des cellules qui composent la lésion. Le TGF- β induit l'activation transcriptionnelle des mitogènes, tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes et le facteur de croissance du tissu conjonctif et les gènes de la matrice extracellulaire, tels que les collagènes, la fibronectine et les thrombospondines. En parallèle, le TGF β supprime la dégradation de la matrice extracellulaire en induisant la transcription des inhibiteurs de l'activateur du plasminogène et des inhibiteurs de la métalloprotéase, conduisant à l'accumulation de la matrice fibrotique. La matrice devient sensible à la calcification par les cellules poussées le long de la lignée ostéoblastique, en partie par l'action du TGF β et des protéines morphogéniques osseuses apparentées. Le TGF β module également l'état d'activation des cellules immunitaires qui entrent dans la lésion et régule leur différenciation en phénotypes phagocytaires et fibroblastiques spécialisés. L'action de TGF β sur la différenciation des progéniteurs en myofibroblastes crée des cellules contractiles qui rétrécissent progressivement la lumière de l'artère dans un processus appelé «remodelage négatif» [336].

La voie du TGF β régule positivement la calcification des CML vasculaires. Les lésions athéroscléreuses évoluées présentent des niveaux accrus de structures TGF β et des structures tissulaires proche de l'os en son sein [333,337]. L'exposition au TGF- β peut induire une différenciation ostéogénique et une calcification des CML vasculaires *in vitro* [334,338]. A l'instar des cellules endothéliales, la signalisation du TGF- β est contrôlée par MGP dans les CML vasculaires [294]. MGP exerce ses effets anti-calcifiants en réprimant la signalisation du TGF β et en permettant à la signalisation Wnt / Notch de maintenir les CML vasculaires dans leur phénotype contractile [339]. En plus de l'activation transcriptionnel ostéogénique, la signalisation du TGF β contribue à la sécrétion de vésicules extracellulaires calcifiantes qui s'accumulent dans la matrice extracellulaire des CML vasculaires [340]. Alors que le TGF β et les TGF β R1 et -2, ainsi que d'autres stimuli, favorisent la calcification des CML vasculaires,

il n'est pas encore certain de savoir si le passage phénotypique vers une cellule calcifiante se produit directement à partir de l'état mature complètement différencié ou s'il y a une cellule souche mésenchymateuse intermédiaire, cellule qui nécessite le signal approprié pour acquérir un phénotype de type ostéoblaste [341,342].

Runx2 (CBFA1) et osterix (SP7)

La différenciation ostéogénique et chondrocytaire des précurseurs mésenchymateux est initialement marquée par l'expression des facteurs de transcription Runx2 et Sox9. L'expression relative de Runx2 et Sox9 détermine ensuite la lignée ostéogénique ou chondrogénique ; Runx2 conduisant au phénotype ostéogénique, tandis que Sox9 se lie à Runx2 et réprime ses actions et orienterait vers la lignée chondrogénique [343]. Dans le phénotype ostéoblastique, le facteur de transcription Runx2 contrôle l'expression des gènes cibles régulant le développement osseux incluant ALP, collagène de type 1, ostéopontine, MMP9 et SP7 [344].

Le facteur de transcription SP7 — également connu sous le nom d'osterix (OSX) — et la voie de signalisation Wnt conduisent à un phénotype ostéogène plutôt que cartilagineux. La perte de SP7 entraîne la formation de cartilage ectopique, mettant en évidence son rôle dans la détermination de la lignée des cellules ostéo / chondrocytaires. Wnt active la β -caténine qui, à son tour, entre dans le noyau et se lie à l'ADN. La β -caténine est nécessaire pour la progression du stade Runx2 au stade Runx2-SP7 des ostéoblastes. D'autres éléments favorisant le phénotype ostéogénique comprennent l'activation du facteur de transcription 4 (ATF4), qui est exprimé dans les ostéocytes plus matures et les protéines morphogéniques osseuses (BMP).

RANK/RANKL/OPG

Ostéoprotégérine (OPG)

L'OPG est une glycoprotéine sécrétée appartenant à la super famille des récepteurs du TNF (TNFRSF11B). Elle a une activité antiostéoclastique en se fixant à son principal ligand RANKL. Sa forme dimérique est biologiquement plus active que sa forme monomérique avec une plus grande affinité pour RANKL [345]. OPG est exprimée de façon préférentielle par les cellules stromales de la moelle osseuse, les CE, les CML, les fibroblastes, monocytes, les ostéoclastes ainsi que certaines cellules tumorales [346,347].

OPG intervient dans le remodelage osseux ; agit comme un récepteur leurre de RANK ligand l'empêchant de se lier à RANK, ainsi elle inhibe la différenciation et l'activation

ostéoclastique [348]. Un déficit en OPG induit ainsi l'ostéoporose, et favorise les fractures et l'accroissement de la vitesse de renouvellement de tissu osseux [349] (Figure 27).

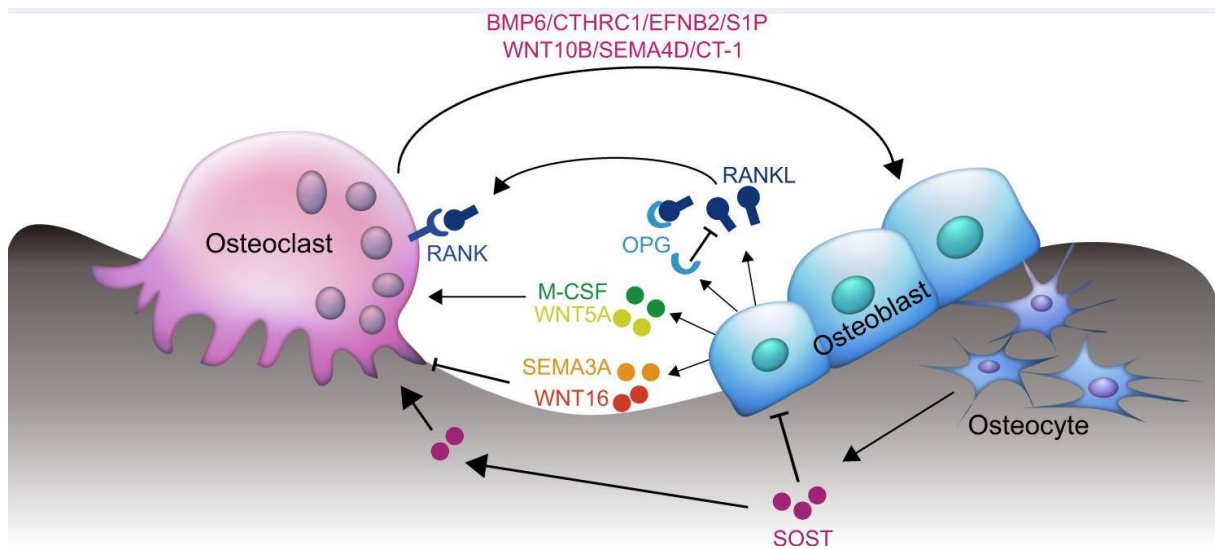


Figure 27. Actions paracrine des ostéoblastes, des ostéocytes et des facteurs dérivés des ostéoclastes. Les molécules sécrétées par les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes s'influencent mutuellement de manière paracrine pour maintenir l'équilibre de la formation osseuse et de la résorption osseuse. Les ostéoblastes activent la formation des ostéoclastes en exprimant le M-CSF, RANKL et WNT5A et inhibent l'activité des ostéoclastes grâce à l'OPG, un récepteur leurre de RANKL, SEMA3A et WNT16. SOST dérivé des ostéocytes inhibe la différenciation des ostéoblastes et stimule l'ostéoclastogenèse. Les ostéoclastes sécrètent également des facteurs de couplage tels que BMP6, CTHRC1, EFNB2, S1P, WNT10B, SEMA4D et CT-1 pour agir sur les ostéoblastes et les ostéocytes et ainsi influencer la formation osseuse [350].

OPG intervient également dans le système vasculaire, les souris déficientes *opg*^{-/-} présentent des calcifications aortiques et rénales. L'absence d'OPG dans des souris athérosclérotiques *apoE*^{-/-} accélère le développement des calcifications athéromateuses [349]. A l'inverse, l'administration d'OPG prévient la formation de calcifications induites par la warfarine ou de fortes doses de vitamine D. Des études sur un modèle animal athérogène ont démontré que l'administration d'OPG n'empêchait pas les lésions athéroscléreuses mais prévenait la calcification de ces lésions [351,352].

De tels effets semblent liés à l'inflammation [353] et peuvent expliquer les calcifications dans certaines zones des plaques d'athérosclérose où sont retrouvés de nombreux macrophages.

Outre son rôle dans l'ostéoclastogenèse, OPG semble jouer des rôles plus larges dans d'autres contextes biologiques (immunité, cancer...). Dans le contexte vasculaire, OPG est notamment présent dans les corps Weibel et Palade des cellules endothéliales associées aux facteurs de von Willebrand. En réponse à des stimuli inflammatoires, l'OPG est relarguée des corps Weibel et Palade des cellules endothéliales [354,355]. OPG induit la survie des cellules

endothéliales par une voie dépendante des intégrines [356,357] et favorise la survie en se liant à TRAIL en empêchant l'effet pro apoptotiques des cytokines de la famille du TNF [358,359]. OPG agit aussi comme un facteur de croissance autocrine/paracrine pour les CML et contribuerait aux progressions des lésions d'athérosclérose.

RANK appartient à la super famille des récepteurs du TNF, il s'agit d'une protéine transmembranaire. RANK est le récepteur de RANK ligand (RANKL) à la surface des précurseurs ostéoclastique et des ostéoclastes matures au niveau osseux, mais il est également exprimé par les lymphocytes, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et les fibroblastes. RANK est une protéine peu modulée par les facteurs exogènes. L'expression de RANK peut être stimulée par le CD40 ligand (CD40L) sur les cellules dendritiques par l'engagement du TCR associée au TGF β et à l'IL4 sur les lymphocytes T. RANK intervient dans la différenciation et la survie des ostéoclastes. L'invalidation de RANK chez la souris conduit à une ostéopétrose sévère ainsi qu'un manque d'ostéoclastes mature [360]. RANK est également impliqué dans la prolifération et le chimiotactisme des cellules endothéliales, il permet une néoangiogenèse comparable du bFGF [361].

RANK ligand est un polypeptide membre de la superfamille du TNF, c'est une protéine transmembranaire dont il existe trois isoformes résultant d'un épissage alternatif [362,363]. Le rôle exact des trois isoformes de RANKL est mal connu. RANKL joue un rôle central dans l'ostéoclastogenèse [363], RANKL est exprimé par un grand nombre de cellules (os, moelle osseuse, cartilage) [364,365], les organes lymphoïdes et par le système vasculaire [346]. RANKL est un facteur indispensable à la formation des ostéoclastes, en se fixant à son récepteur RANK à la surface des cellules préostéoclastes, il induit une activation de RANK et en présence de M-CSF contribue à leur différenciation en ostéoclastes mature. RANKL est un facteur de survie des ostéoclastes matures [366,367], lorsque RANKL est invalidée, on observe une ostéopétrose sévère associée à une absence d'ostéoclastes fonctionnels [368].

Au niveau vasculaire, RANK et RANKL ne sont pas détectés dans les vaisseaux sains non calcifiés [346], sous l'action de cytokines pro inflammatoire comme l'IL1 β ou le TNF α les cellules endothéliales expriment fortement OPG et RANKL [346,369]. RANKL surexprimé à la surface des cellules endothéliales peut alors permettre la différenciation ostéoclastique de précurseurs monocytaires [346]. OPG et RANKL produits par les cellules endothéliales ont un effet autocrine. RANKL prévient partiellement la mort de cellules endothéliales via la voie PI3kinase/AKT [370]. De plus, l'anticorps humanisé dirigé contre RANKL (denosumab) a

prouvé son efficacité dans les atteintes vasculaires en prévenant les dépôts de calcium dans les artères de souris exprimant RANKL [371].

OPG et RANKL interviennent dans la stabilité de la plaque d'athérome [372]. Au cours des situations inflammatoires, les cellules endothéliales sécrètent des quantités importantes d'OPG induisant l'expression de molécules d'adhésion à leur surface et augmente la fixation des monocytes, des lymphocytes. La baisse du ratio OPG/ RANKL induit une augmentation de l'expression de métalloprotéases et de leur activité pourrait favoriser une diminution de l'épaisseur de la chape fibreuse et favoriserait la formation de thrombus (Figure 26).

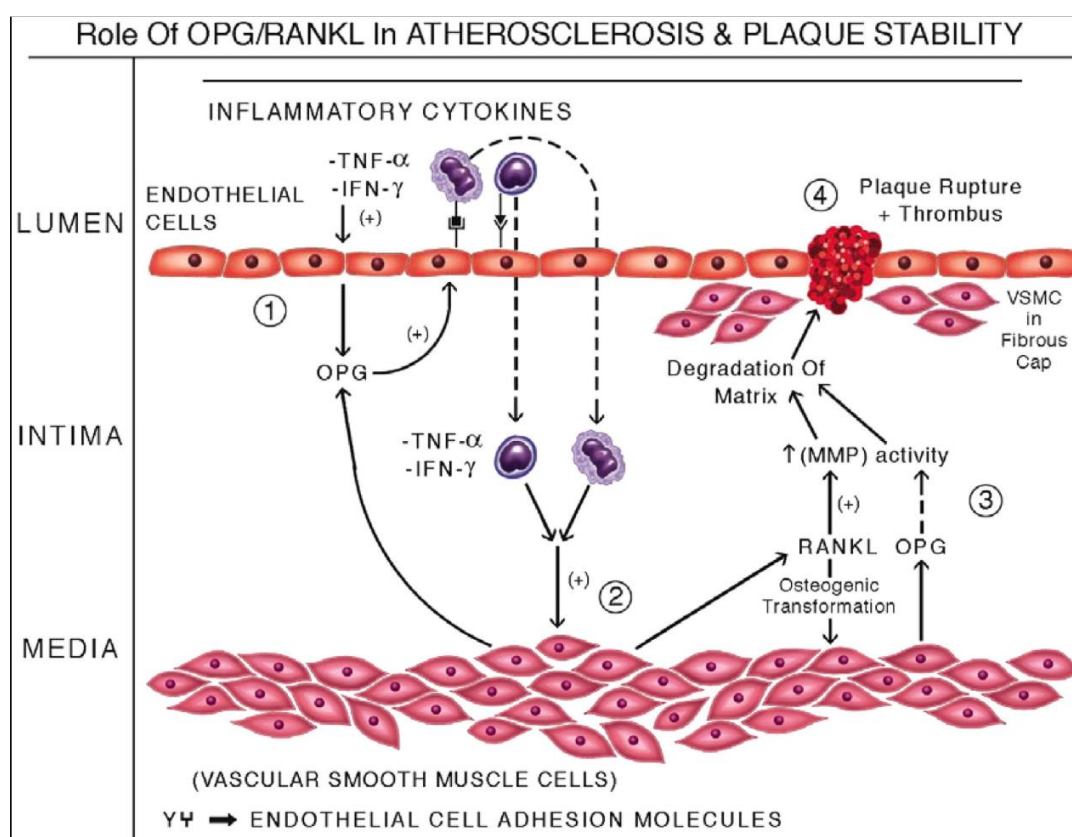


Figure 26. Rôle de l'OPG dans l'athérosclérose. 1. En présence de cytokines pro-inflammatoires, l'expression d'OPG est régulée dans les cellules endothéliales, ce qui augmente l'expression des molécules d'adhésion des cellules endothéliales, contribuant à la transmigration des monocytes et des lymphocytes dans l'intima de la paroi vasculaire. 2. Les cellules inflammatoires régulent à la hausse l'expression de l'activateur du récepteur du facteur nucléaire κB (RANKL) et forment des CML vasculaires. 3. RANKL avec OPG à des ratios OPG / RANKL inférieurs augmentent l'activité de la métalloprotéinase matricielle. 4. L'augmentation de l'activité de la métalloprotéinase matricielle (MMP) entraîne la dégradation de la matrice extracellulaire et réduit l'épaisseur de la coiffe fibreuse, dont l'érosion provoque la formation de thrombus. IFN = interféron; TNF = facteur de nécrose tumorale [372].

Ostéopontin (OPN)

OPN est une protéine acide extracellulaire, composée de phosphosérines qui ont une forte affinité pour les hydroxyapatites. OPN est retrouvé dans les tissus minéralisés comme l'os. Dans des modèles murin, l'invalidation de l'OPN est un facteur associé aux calcifications vasculaires [373]. L'OPN régule la minéralisation de deux façons : d'une part par une inhibition de la croissance des cristaux d'apatite et d'autre part elle stimule les fonctions ostéoclastiques. OPN est absente des artères saines et est abondamment retrouvée dans les plaques calcifiées [374].

1.4 Épigénétique et micro-ARN

L'épigénétique regroupe l'ensemble des mécanismes pré- et post-transcriptomiques qui modifient de manière réversible, transmissible et adaptative l'expression génique sans modifier les séquences nucléotidiques. L'épigénétique peut expliquer les caractères acquis éventuellement transmis entre génération. Les modifications épigénétiques sont induites par l'environnement au sens large, la cellule reçoit en permanence de nombreux signaux informant sur son environnement de manière à ce qu'elle se spécialise en fonction des situations. Ces signaux peuvent être en lien avec un comportement (alimentation, tabagisme, stress...) et conduisent à des modifications dans l'expression de nos gènes sans en affecter leurs séquences. Ce phénomène peut être transitoire mais il existe également des modifications épigénétiques pérennes qui persistent bien après la disparition du signal qui les a induits. L'épigénétique se traduit notamment au moyen de marques covalentes biochimiques imposées par des enzymes sur l'ADN ou sur les protéines histones. Les principaux mécanismes pré-transcriptomiques sont : la méthylation des histones qui se déroule principalement au niveau des résidus lysine et induit une fermeture de la chromatine en favorisant l'enroulement de l'ADN autour des histones ; l'acétylation qui se déroule également sur les lysines et entraîne, à l'inverse, une ouverture de la chromatine permettant la transcription ; la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation des histones ont également un rôle important dans le contrôle du remodelage de la chromatine et de l'expression génique. Parmi les mécanismes post-transcriptionnels de l'épigénétique, les microARNs sont devenus au cours de ces dernières années un champ d'investigation en recherche fondamentale et appliquée très prometteur, notamment pour développer de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques.

1.4.1 Micro-ARN

Les micro-ARN (miARN) sont de courts acides ribonucléiques simple brin, non codants, hautement conservés au cours de l'évolution et propre aux cellules eucaryotes. Ils sont de tailles variables, le plus souvent entre 20 et 24 nucléotides. Les miARN sont des régulateurs traductionnels capables d'inhiber l'expression de nombreux gènes cibles. Leur appariement avec une séquence complémentaire de l'ARN messager (ARNm) du gène cible conduit à une répression de la traduction ou à une dégradation de cet ARNm. Actuellement, plus de 2000 miARN humains ont été identifiés, et on pense qu'ils régulent plus de 60% des gènes codant

les protéines humaines, beaucoup de ces miARN étant capable de se fixer à de nombreux gènes cibles (Figure 28) [375].

La plupart des miARN de mammifères sont transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase II, en tant que molécules précurseurs (pré-miARN) [376]. L'exportation de pré-miRNA est médiée par un récepteur de transport nucléaire, nommé exportin-5 (Exp5). Une fois dans le cytoplasme, les pré-microARN subiront une étape de maturation sous l'action de l'enzyme ARN polymérase de type III dicer. Ils deviendront des micro-ARN double brin d'une longueur d'environ 22 nucléotides et s'associeront au complexe de silencing induit par l'ARN (RISC) qui facilite et stabilise les interactions miARN-ARNm. Ils peuvent se lier à la région 3' non traduite (UTR) de leurs transcrits cibles, produisant une réduction de l'expression génique par blocage traductionnel ou dégradation de l'ARNm [377] (Figure 29).

La liaison de l'ARNm est provoquée par la complémentarité de la séquence du miARN (7-8 nucléotides à l'extrémité 5' de la molécule de miRNA) avec une séquence complémentaire dans l'ARNm cible. Cette correspondance imprécise donne lieu à de nombreux ARN contenant des sites de liaison potentiels pour un miARN donné. Par conséquent, un seul miARN a la possibilité de réguler des centaines de cibles différentes [378].

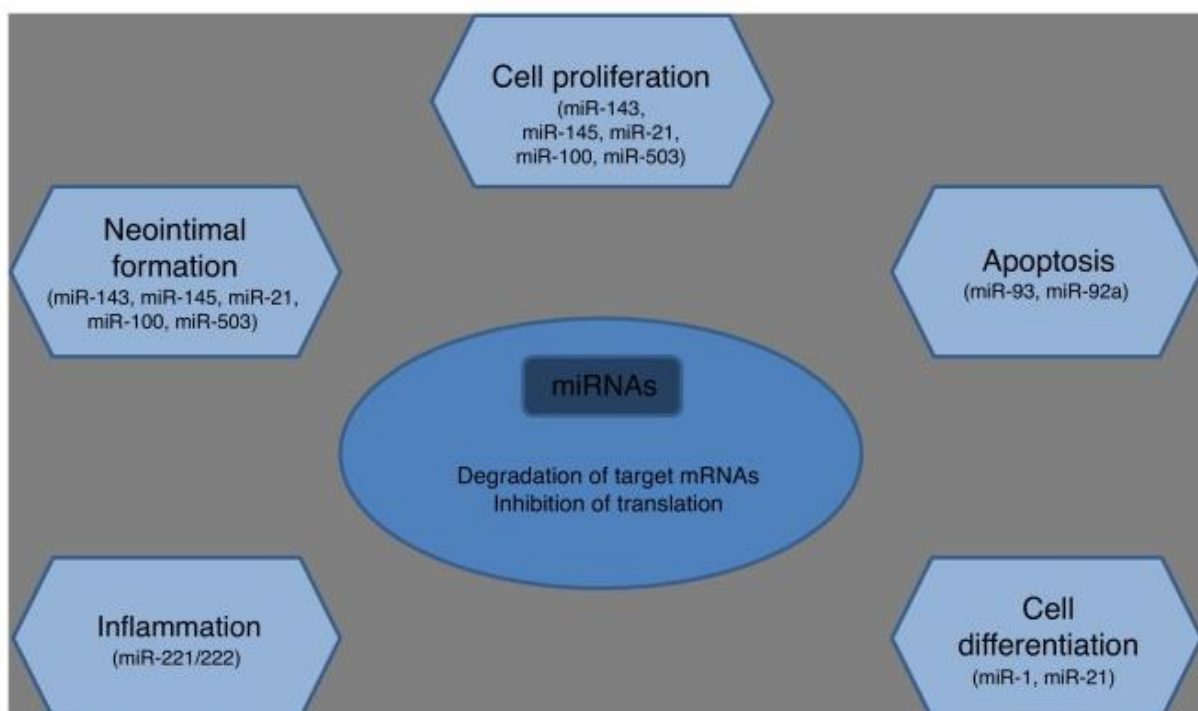


Figure 28 : Principaux concepts: miARN régulateur clé des cascades générales d'expression génique telles que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et l'inflammation [379].

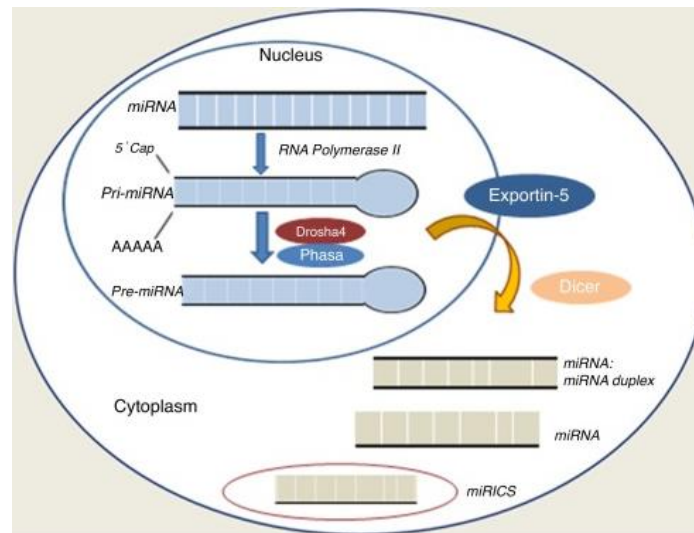


Figure 29 : Voie miARN. Les microARN sont transcrits par l'ARN polymérase II sous forme de grands précurseurs d'ARN appelés pré-miARN et comprennent un capuchon 5 'et une queue poly-A3. Les pré-miARN sont traités dans le noyau par le complexe de microprocesseurs, constitué de l'enzyme RNase III Drosha4 et de la protéine de liaison à l'ARN double brin, Pasha. Les pré-miARN sont ensuite exportés dans le cytoplasme par le karyophérine exportin 5 (Exp5). Une fois dans le cytoplasme, les pré-miARN subissent une étape de traitement supplémentaire par l'enzyme RNase III Dicer générant le miARN, un ARN double brin d'une longueur d'environ 22 nucléotides. Dicer initie également la formation du complexe de silencing induit par l'ARN (RISC). RISC est responsable de l'extinction de gènes observée en raison de l'expression de miARN et de l'interférence ARN [379].

1.4.2 Micro-ARN et pathologies artérielles périphériques

Des miARN spécifiques ont été établis comme régulateurs du phénotype des CML vasculaires en ciblant des facteurs de transcription, qui jouent le rôle de commutateurs moléculaires pour la différenciation de ces cellules [380,381].

Récemment, les miARN-143/145 ont été identifiés comme les miARN les plus abondants dans les artères normales et sont principalement localisés dans les CML vasculaires. Il a été démontré que lorsqu'ils sont régulés à la baisse, le groupe miARN-143/145, co-exprimé à partir d'un seul promoteur, contrôle le passage du phénotype contractile au phénotype synthétique, permettant aux CML vasculaire de migrer et de proliférer. Ainsi, les miARN-143/145 étant régulés à la baisse dans les vaisseaux endommagés ou athérosclérotiques, pourraient être responsables de la modification phénotypique des CML vasculaires dans ces contextes pathologiques [382]. De plus, la signalisation du PDGF module l'expression de

miARN-221. Ce miARN régule l'expression des gènes CML vasculaires et la prolifération cellulaire [383].

En clinique, dans l'AOMI, la fonction de miARN-21 a été évaluée dans les artères humaines et les CML vasculaires [384]; miARN-21 régule la fonction des CML vasculaires en inhibant l'expression de la tropomyosine 1. En outre, une forte expression de miARN-503 a été retrouvée dans le plasma de patients diabétiques avec ischémie critique. Le rôle du miARN-503 dans les dysfonctions endothéliales induites par le diabète a été établi, contribuant ainsi à une angiogenèse post-ischémique altérée, et démontrant que la surexpression du miARN-503 inhibait également la prolifération et la migration des CML vasculaires [385]. Le miARN-503 pourrait ainsi être considéré comme un suppresseur de la néovascularisation post-ischémique dans le diabète et une cible thérapeutique potentielle pour améliorer la cicatrisation des tissus ischémiques.

Dans l'AOMI, on observe également une augmentation significative pour le miARN-130a, le miARN-210, le mi-ARN-221, le miARN-27b et une diminution du miARN-222 [386]. L'augmentation des niveaux de miARN-130a et de miARN-27b était en corrélation avec la sévérité de la maladie (stade de Fontaine). Stather et al. ont établi un groupe de miARN spécifiques, tels que miARN-1 et 7e, miARN-15b, miARN-16, miARN-20b, miARN-25, miARN-26b, miARN-27b, miARN-28-5p, miARN-126, miARN-195, miARN-335 et miARN-363 régulés à la baisse chez les patients atteints de maladie artérielle périphérique et peuvent les distinguer des individus en bonne santé, illustrant de nouvelles applications diagnostiques grâce à ces miARN [387].

1.4.3 Micro-ARN et ossification

De nombreuses études récentes montrent que les miARN peuvent moduler l'ostéogenèse et la calcification, en régulant différents aspects clé de ces processus.

Matrice extracellulaire

Les ostéoblastes sécrètent une variété de protéines de MEC extrêmement spécialisée qui servent d'échafaudage sur lequel le minéral est déposé dans une étape de maturation finale, tandis que d'autres confèrent une flexibilité structurelle pour résister à la contrainte de compression et de traction. Tout miARN ciblant les ARNm des glycoprotéines non collagéniques et des protéoglycanes tels que l'ostéonectine, la Bone sialoprotein et

l'ostéocalcine (OCN), qui sont tous impliqués dans la calcification de la MEC [388], permettrait un contrôle important sur la minéralisation de la matrice.

Ostéogenèse

Les miARN-29a et miARN-29c ciblant l'ostéonectine semblent en effet jouer un rôle dans la maturation des ostéoblastes, et leurs niveaux d'expression augmentent au cours de l'ostéogenèse tardive [389]. De même comparable, le miARN-125b, qui cible directement l'ARNm de l'OCN, est fortement exprimé dans les ostéoblastes humains primaires isolés de l'os trabéculaire humain et est donc impliqué dans l'homéostasie osseuse normale [390]. Dans l'os, la vitamine D liée à son récepteur, VDR, participe au processus de minéralisation, et une perturbation de la voie VDR peut conduire à des défauts de minéralisation tels que ceux trouvés dans le rachitisme [391]. L'importance du miARN-125b dans l'identité des ostéoblastes est illustrée par le fait que le miARN-125b exogène bloque la différenciation, alors que son inhibition induit indirectement une activité phosphatases alcalines (ALP) plus élevée [392]. De plus, dans le cancer du sein et de la prostate, souvent métastasé aux os [393], la régulation négative de miARN-125b augmente l'expression de la cible VDR [394], démontrant ainsi l'importance de miARN-125b dans l'ostéogenèse. Alors que les seuls miARN actuellement signalés ciblant directement l'ALP de type osseux sont mi-ARN-204/211 [395], 16 sites de liaison de miARN conservés supplémentaires sont prédits dans son 3'UTR (microna.org). Puisque l'expression d'ALP maintient non seulement la minéralisation de la matrice, mais qu'elle initie la minéralisation de la matrice, elle peut être exprimée par une cellule souche mésenchymateuse, comme cela a été confirmé pour le miARN-204 [396]. Une fois entièrement intégrés dans la matrice, les ostéoblastes acquièrent de nouvelles fonctions lorsqu'ils se différencient en ostéocytes, ce qui permet de détecter et de répondre à la stimulation mécanique d'une manière anabolique. Cette réponse est médiée par la cyclooxygénase-2 (COX2) [397,398], qui produit des prostaglandines stimulant la prolifération [399]. Bien qu'aucun miARN régulateur de Cox2 n'ait été identifié dans le contexte des ostéoblastes ou de la charge mécanique, miARN-101a et miARN-199a régulent négativement la Cox2 chez les embryons précoces de souris lors de l'implantation [400]. Identifié dans plusieurs cribles de mi-ARN, miARN-199a s'associe à la différenciation des ostéoblastes [401,402], suggérant que son identification en tant qu'« ostéo mi-ARN » peut être liée à son contrôle de Cox2. De plus, bien qu'ils ne soient pas directement liés à Cox2, miARN-218, miARN-191, miARN-3010a et miARN-33 ont récemment été identifiés dans des cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 pour répondre à une contrainte mécanique [403].

Avant la calcification de la matrice, les ostéoprogéniteurs proliférants sécrètent l'OPN [404], codé par *Spp1*. Alors que plusieurs microARN ont été associés à la régulation *Spp1* (mi-ARN 541 [405], miARN-21 [406]), aucun miARN directement « silencing » *Spp1* n'a été identifié dans les ostéoblastes ou leurs précurseurs. Cependant, miARN-299-5p cible *Spp1* dans les cellules cancéreuses du sein [407] et miARN-127-5p cible *Spp1* dans les chondrocytes [408] et ainsi ils peuvent également le faire dans les pré-ostéoblastes. Le composant non collagène de la MEC ne constitue qu'une petite partie. En effet, plus de 90% des protéines de la MEC sécrétées sont des fibrilles collagéniques, principalement celles du collagène de type I. Puisque le collagène est si abondant, il n'est pas surprenant que la perturbation de la production de collagène soit une cause profonde de l'ostéogenèse imparfaite [409,410]. Tout miARN régulant les gènes du collagène peut donc non seulement être important pour l'ostéogenèse normale, mais leur dérégulation pourrait potentiellement être impliquée dans l'étiologie de l'ostéogenèse imparfaite. Par exemple, miARN-29b régule directement *Col1a1*, *Col1a2* et *Col3a1* dans les cellules hépatiques [411]. La sécrétion des protéines de la MEC diminue en association avec une différenciation prolongée, et la fonction de miARN-29b dans les ostéoblastes pourrait être de supprimer l'expression des protéines de collagène permettant à la matrice de fibrilles de collagène de mûrir pour le dépôt minéral [412]. Par conséquent, l'expression des miARN semblables à miARN-29b devrait être plus élevée que les ostéoblastes passent à l'étape de calcification. L'effet pro-ostéogénique de miARN-21 peut résulter d'une régulation indirecte de *Col1a1*, puisque miARN-21 provoque indirectement une expression élevée de *Col1a1* et à son tour le dépôt de collagène de type I dans un modèle murin de fibrose pulmonaire [413]. Fait intéressant, COL1A1 recombinant régule positivement l'expression de miARN-21, illustrant une boucle de rétroaction inconnue entre la protéine et le miARN qui empêche probablement l'arrêt complet du transcrit [413]. miARN-21 est également augmenté par le TGFβ pro-ostéogénique et les BMPs, mais étonnamment pas par le contrôle transcriptionnel, mais plutôt par un traitement amélioré du pré-miARN [414]. Une autre protéine ECM produite dans les pré-ostéoblastes est la fibronectine, une protéine d'adhésion qui se lie aux intégrines pour influencer la prolifération cellulaire et le développement des tissus [415,416]. Bien que miARN-200b et miARN-377 régulent la fibronectine dans les cellules tubulaires proximales des reins et dans la neuropathie diabétique respectivement, un rôle de ces miARN dans l'ostéogenèse reste à déterminer [417,418].

Aux vues de ces nombreuses données qui montrent le rôle majeur que pourrait avoir les miARN dans les pathologies vasculaires et les processus de calcification et ossification, nous avons entrepris d'identifier les miARN et leurs gènes cible associés aux calcifications athéromateuses dans le cadre de ces PAD.

Le tableau 1 synthétise les principaux miARN décrits au cours des maladies artérielles périphériques et lors des processus d'ostéogénèse.

miARN	Modalité d'intervention et type cellulaire régulé par miARN
Maladie artérielle périphérique	
miARN prolifération, migration cellulaire	
miARN-21	miARN-21 régule la fonction des CML vasculaires en inhibant l'expression de la tropomyosine 1 [384].
miARN-143/145	Impliqué dans la migration et la prolifération des CML vasculaires, miARN-143/145 régulés à la baisse dans les vaisseaux endommagés ou athérosclérotiques, pourraient être responsables de la modification phénotypique des CML vasculaires dans ces contextes pathologiques [382].
miARN-221	La signalisation du PDGF module l'expression de miARN-221. Ce miARN régule l'expression des gènes des CML vasculaires et la prolifération cellulaire [383].
miARN-503	La surexpression du miARN-503 inhibe la prolifération et la migration des CML vasculaires, suppresseur de la néovascularisation post-ischémique dans le diabète ; intervient dans la dysfonction endothéliale [385].
miARN biomarqueurs potentiels	
miARN-1, miARN-7 ^e , miARN-15, miARN-16, miARN-20b miARN-25, miARN-26b miARN-27b, miARN-28-5p miARN-126, miARN-195, miARN-222, miARN-335, miARN-363	miARN-let 7e, miARN-15b, miARN-16, miARN-20b, miARN-25, miARN-26b, miARN-27b, miARN-28-5p, miARN-126, miARN-195, miARN-335 et miARN-363 régulés à la baisse chez les patients atteints de maladie artérielle périphérique et peuvent les distinguer des individus sains, illustrant des applications diagnostiques potentielles grâce à ces miARN [386,387].
miARN-27b, miARN-130a, miARN-210, miARN-221	Au cours de l'AOMI augmentation significative pour le miARN-130a, le miARN-210, le miARN-221, le miARN-27b, possible biomarqueur de l'AOMI [386]. L'augmentation des niveaux de miARN-130a et de miARN-27b était en corrélation avec la sévérité l'AOMI [386].
ossification	
Action sur les ostéoblastes, ostéocytes	
miARN-29a, miARN-29c miARN-125b	miARN-29a et miARN-29c, miARN-125b ciblant l'ostéonectine semblent jouer un rôle dans la maturation des ostéoblastes, et leurs niveaux d'expression augmentent au cours de l'ostéogénèse tardive [389,390].
miARN-33, miARN-191 miARN-218, miARN-3010a	miARN-218, miARN-191, miARN-3010a et miARN-33 ont récemment été identifiés dans des cellules ostéoblastiques pour répondre à une contrainte mécanique [403].
miARN-125b	miARN-125b exogène bloque la différenciation des ostéoblastes, [392,394].
miARN-199a	miARN-199a s'associe à la différenciation des ostéoblastes [401,402].
Action sur la matrice extra-cellulaire	
miARN-21	miARN-21 est augmenté par le TGFβ pro-ostéogénique et les BMPs [414].
miARN-29b	Dans les ostéoblastes, miARN-29b pourrait supprimer l'expression des protéines de collagène permettant à la matrice de fibrilles de collagène de favoriser les dépôts minéraux [412].
miARN-204/211	miARN-204/211 ciblent directement les phosphatases alcalines de type osseux qui maintient et initie la minéralisation de la matrice, ils peuvent être exprimés par les cellules souches mésenchymateuses [395,396].

Tableau 1 : Synthèse de principaux miARN décrits au cours de la maladie artérielle périphérique et lors des processus d'ostéogénèse.

1.5 Concept de l'hétérogénéité artérielle et hétérogénéité des PAD

Il existe une hétérogénéité artérielle, que ce soit pour les artères saines ou celles souffrant d'athérosclérose. En effet, comme cité précédemment, les artères ont une origine embryologique distincte, elles sont issues de cellules de la crête neurale pour l'aorte thoracique et les artères carotides alors que l'aorte abdominale et les artères iliofémorales ont une origine mésodermique [264]. De plus, il a été montré de longue date dans un modèle canin que lorsque l'on transplante une aorte abdominale au niveau thoracique et réciproquement, les comportements des segments greffés correspondent, en terme de calcifications, aux comportements qu'elles auraient eus au niveau de leur site anatomique initiale faisant suspecter que les processus à l'origine des calcifications sont intrinsèques au segment artériel et peu dépendant du régime de flux auquel elles sont soumises [419].

L'observation clinique quotidienne ainsi que des données de la littérature montrent l'existence d'une hétérogénéité de l'expression de l'athérome en fonction du territoire artériel. La susceptibilité des artères aux facteurs de risque cardiovasculaire que son l'hypertension artérielle, le tabac, le diabète l'âge est différentes en fonction du territoire artériel [420]. Ainsi, en chirurgie cardiaque, l'utilisation des artères thoraciques internes pour les revascularisations coronaire est d'usage fréquent. En effet, l'artère thoracique interne est le plus souvent indemne de lésion alors que dans le même temps, les artères coronaires sont le siège de lésions athéromateuses sévères. De la même façon, le chirurgien vasculaire privilégie l'artère fémorale profonde en cas de revascularisation à l'étage fémoral car celle-ci est le plus souvent épargnée par la maladie athéromateuse. De plus, lors des endartériectomies à l'étage fémoral, les plaques sont le plus souvent « dures » pour les fémorales alors qu'elles apparaissent « molles » au niveau carotidien.

De la même façon, les résultats des traitements endovasculaires suggèrent une hétérogénéité artérielle selon le territoire traité. Des études cliniques ont permis de montrer que les taux de resténose *intra-stent* variaient considérablement d'une localisation artérielle à une autre. Par exemple, la fréquence de la resténose à un an au niveau carotidien est évaluée entre 6 et 9 %, à 20 % au niveau fémoral commun et entre 30 et 40 % au niveau fémoral superficiel [168,169]. Concernant les artères de plus petits calibres telles que les artères jambières, les taux de resténose *intra-stent* dépassent ceux observés dans le réseau coronarien (30–50 %

versus 10–35 %)[170,171]. De plus, le score calcique médian est plus élevé au sein des artères iliaques qu'au sein des artères carotidiennes [179].

Etude comparative des lésions athéromateuses (ECLA)

À partir de ces différents constats, nous avons émis l'hypothèse qu'il existait une différence phénotypique des plaques athéromateuses selon le territoire artériel. Le laboratoire d'accueil INSERM UMR1238 a mis en place l'étude descriptive (Etude comparative des lésions athéromateuses [ECLA]) en comparant les plaques athéromateuses carotidienne et fémorale de patients opérés d'endartériectomie [254]. Nous avons noté des différences à la fois quantitatives et qualitatives entre les plaques carotidiennes et fémorales. En effet les plaques carotidiennes étaient plus fréquemment de nature lipidique (72 %, n=32/45) tandis que les plaques fémorales étaient plus fréquemment de nature fibrocalcique (93 % n= 40/43). La prévalence de la métaplasie ostéoïde distinguait particulièrement les plaques fémorales (63 %, n= 29/43) par rapport aux plaques carotidiennes (20 % n= 9/45). Sur le plan qualitatif, la teneur en calcium était plus élevée au sein des plaques fémorales, alors que la teneur en cholestérol était plus élevée au sein des plaques carotidiennes [254].

Afin de comprendre quels mécanismes étaient à l'origine des processus de calcification en fonction du lit artériel nous avons souhaité évaluer le lien entre les différents facteurs de risque cardiovasculaire et le type histologique de calcification artérielle. Nous avons également évalué le lien entre les expressions différentielles de gènes en fonction des territoires artériels en comparant les artères carotides, fémorales et infra-poplitées.

Au niveau moléculaire, nous avons enfin étudié le lien entre le TGF β et la propension des artères fémorales à la minéralisation.

Une meilleure compréhension des processus intervenant dans les calcifications artérielles périphériques pourrait être utile pour le diagnostique, la prise en charge, mais également pour la mise au point de ballons/stents actifs qui pourraient interférer avec ces processus de calcification de manière spécifique en fonction du territoire ciblé.

2. Implication des cellules musculaires lisses dans les calcifications artérielles en fonction du territoire avec évaluation de l'effet du TGF β sur le processus de calcification

Ce premier travail avait pour objectif de confirmer l'hétérogénéité des calcifications en fonction du territoire artériel, élargie à 4 territoires périphériques, d'évaluer la composition cellulaire au niveau des calcifications, et d'identifier les processus moléculaires à l'origine de ces différences.

Des plaques d'athérome de 4 territoires ont été étudiés (aorte, carotides, fémorales, infra poplitées). Les artères de donneurs d'organes ont servi de contrôle sans athérome. L'analyse histologique des échantillons d'artères athérosclérotiques de la biocollection ECLAGEN a mis en évidence que la composition des plaques au niveau de l'aorte abdominale et carotides était riche en lipides et en inflammation, alors que les plaques fémorales et infra poplitées présentaient plus de fibrose et de calcification. La présence d'ossification des plaques est particulièrement importante dans le territoire fémoral. La répartition cellulaire est également différente au sein des plaques avec significativement moins de cellules musculaires lisses au niveau des plaques aortiques. Les macrophages sont plus fréquemment retrouvés dans les plaques carotidiennes que dans les fémorales, et les cellules endothéliales sont en proportion plus importantes dans les plaques infra poplitées par rapport aux fémorales et aux carotides. Sur le plan histologique, en termes de calcification, nous n'avons pas retrouvé de différence significative pour ces cellules à l'échelle de la plaque globale, qui présente souvent plusieurs types de calcification. Les cultures de CML primaires issues de ces différents territoires sains ont mis en évidence que celles issues des artères fémorales ont une propension plus importante à la calcification, avec une surexpression de Runx2, ALP et ostéopontine notamment.

Ces différences fonctionnelles sont retrouvées au niveau moléculaire grâce à une analyse de puces à ADN. L'analyse transcriptomique a permis de ségréger les artères en fonction de leur origine anatomique. Ainsi, de nombreux gènes associés à la réponse immunitaire, à l'ossification et au métabolisme lipidique étaient différentiellement exprimés entre les carotides et fémorales. Parmi ces gènes ont été retrouvé des membres de la famille du TGF β . Pour valider l'importance du TGF et de son récepteur principal (TGF β R1), nous avons inhibé

l'expression de TGF β R1 dans les CML des carotides et des fémorales. Nous avons observé que l'inhibition de TGF β R1 empêchait la minéralisation des CML de fémorales, sans affecter la minéralisation des CML de carotides, laissant ainsi entrevoir un rôle significatif de TGF β dans les susceptibilités différentes de calcification des artères périphériques.

RESEARCH ARTICLE

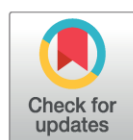
Implication of molecular vascular smooth muscle cell heterogeneity among arterial beds in arterial calcification

Olivier Espitia^{1,2*}, Mathias Chatelais^{1*}, Marja Steenman³, Céline Charrier¹, Blandine Maurel^{1,2}, Steven Georges¹, Rémi Houlgatte⁴, Franck Verrecchia¹, Benjamin Ory¹, François Lamoureux¹, Dominique Heymann^{5,6,7}, Yann Gouëffic^{1,2}, Thibaut Quillard^{1,2*}

1 INSERM, UMR 1238, Nantes, France; Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Laboratoire « Sarcome osseux et remodelage des tissus osseux calcifiés », Faculté de Médecine, Nantes, France, **2** CHU Hôtel Dieu, Nantes, France, **3** Institut du Thorax, Inserm UMR1087, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Nantes, France, **4** Inserm U954, Faculty of Medicine, Nancy, France, DRCI, University Hospital of Nancy, Nancy, France, **5** Institut de Cancérologie de l'Ouest, site René Gauducheau, Boulevard Professeur Jacques Monod, Saint-Herblain, France, **6** University of Sheffield, Department of Oncology and Metabolism, INSERM, European Associated Laboratory "Sarcoma Research Unit", Medical School, Sheffield, United Kingdom, **7** University of Nantes, Faculty of Medicine, Nantes, France

* These authors contributed equally to this work.

* thibaut.quillard@univ-nantes.fr



OPEN ACCESS

Citation: Espitia O, Chatelais M, Steenman M, Charrier C, Maurel B, Georges S, et al. (2018) Implication of molecular vascular smooth muscle cell heterogeneity among arterial beds in arterial calcification. PLoS ONE 13(1): e0191976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191976>

Editor: Francis Miller, Jr., Duke University, UNITED STATES

Received: October 20, 2017

Accepted: January 15, 2018

Published: January 26, 2018

Copyright: © 2018 Espitia et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. Raw Microarray Data can be found at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=ibwbossexboxzmt&acc=GSE84012>.

Funding: This study has been supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PROG/11/58) to YG, the European Commission (FP7 People: Marie-Curie Actions, grant 627418, <https://ec.europa.eu/research/mariecurieactions/>) to TQ, the Fondation de l'Avenir pour la Recherche

Abstract

Vascular calcification is a strong and independent predictive factor for cardiovascular complications and mortality. Our previous work identified important discrepancies in plaque composition and calcification types between carotid and femoral arteries. The objective of this study is to further characterize and understand the heterogeneity in vascular calcification among vascular beds, and to identify molecular mechanisms underlying this process. We established ECLAGEN biocollection that encompasses human atherosclerotic lesions and healthy arteries from different locations (abdominal, thoracic aorta, carotid, femoral, and infrapopliteal arteries) for histological, cell isolation, and transcriptomic analysis. Our results show that lesion composition differs between these locations. Femoral arteries are the most calcified arteries overall. They develop denser calcifications (sheet-like, nodule), and are highly susceptible to osteoid metaplasia. These discrepancies may derive from intrinsic differences between SMCs originating from these locations, as microarray analysis showed specific transcriptomic profiles between primary SMCs isolated from each arterial bed. These molecular differences translated into functional disparities. SMC from femoral arteries showed the highest propensity to mineralize due to an increase in basal TGFβ signaling. Our results suggest that biological heterogeneity of resident vascular cells between arterial beds, reflected by our transcriptomic analysis, is critical in understanding plaque biology and calcification, and may have strong implications in vascular therapeutic approaches.

Médicale Appliquée (ET4-720, <http://www.fondationdelavenir.org/>) to TQ, the Centre Hospitalier Universitaire de Nantes to TQ, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE14-0012-01, www.agence-nationale-recherche.fr) to BO. Thibaut Quillard's salary has been provided by the Fondation Lefoulon Delalande (<http://lefulon-delalande.institut-de-france.fr>), the European commission (FP7 People: Marie-Curie Actions, grant 627418, <https://ec.europa.eu/research/mariecurieactions/>), and the Centre Hospitalier Universitaire de Nantes. Steven George's salary has been provided by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE14-0012-01, www.agence-nationale-recherche.fr). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Vascular calcification is a strong and independent predictive factor for cardiovascular complications and mortality, the leading cause of death worldwide [1]. Accumulating evidence show that calcification in atherosclerosis mechanically affects plaque stability both directly and indirectly. Destabilizing calcification (approx. 5 μ m) increases mechanical stress within the fibrous cap due to the important mismatch between the stiff microcalcifications and the collagen-rich cap [2–4]. Moreover, advanced and extensive calcification contributes to plaque stability, while increasing arterial stiffness and hypertension, an important risk factor for plaque rupture [5–8].

Despite being exposed to similar risk factors, peripheral arteries develop heterogeneous lesions. Our previous work showed in a population with similar demographic and biological data that carotid arteries develop predominantly lipid-rich lesions and microcalcifications, while femoral arteries develop fibrotic lesions, with extensive calcification and frequent presence of osteoid tissue [9–11].

Historically considered to be a passive process related to aging, it is now recognized as an active process, closely related to bone metabolism due notably to the presence of actual bone structure and numerous typical bone-related molecules and cell types in calcified lesions. Vascular smooth muscle cells (SMC), and pericytes found in advanced lesions with neovascularization, can mineralize directly when cultured in osteogenic milieu, and could directly contribute to plaque calcification [12,13]. Recent work by Hutcheson et al demonstrated that Macrophages and SMC release matrix vesicles and calcifying exosomes in response to inflammation and apoptosis [14–16]. The formation of matrix vesicles initiates the phospho-calcic nucleation and early hydroxyapatite formation, a similar process found in growth plate in bone.

Molecular mechanisms directly regulating the formation of ectopic calcification in vasculature remain poorly understood. Major bone related molecules (OPG, RANKL, BMP, MGP. . .) have been found in calcified lesions but specific molecular determinants orchestrating plaque mineralization in arterial beds remain poorly understood [17].

To elucidate these mechanisms, and to better understand plaque calcification heterogeneity among vascular beds, we used our ECLAGEN biocollection of human atherosclerotic lesions from different arterial locations (abdominal and thoracic aorta, carotid, femoral, and infrapopliteal arteries).

Our results show that lesion composition differs between these locations. Femoral arteries are the most calcified arteries overall. They develop more advanced calcifications (sheet-like, nodule), and are highly susceptible to osteoid metaplasia (OM). These discrepancies could derive from intrinsic differences between SMCs originating from these locations. SMC from femoral arteries have the highest propensity to mineralize due to an increase in basal transforming growth factor β (TGF β) signaling.

Material and methods

Patients and biological samples

ECLAGEN biocollection included two main groups of patients. First, atherosclerotic diseased arteries were harvested from patients undergoing arterial open surgery for at least one arterial location: carotid artery (CA), thoracic (TA) and abdominal aorta (AA), and common femoral (FA) and infrapopliteal arteries (PA). Non-atheromatous, healthy arteries were harvested from organ donors. In this case, up to five arterial territories, as previously described, were collected from the same donor. For all patients, demographic data, patient medical history and blood

Table 1.

	AA (n = 46)	CA (n = 87)	FA (n = 53)	PA (n = 25)	Total (n = 211)	
Smoking	22 (48%)	20 (23%)	22 (42%)	2 (8%)	66 (31.3%)	<0,001
Hypertension	22 (48%)	65 (75%)	38 (72%)	23 (92%)	148 (70.1%)	<0,001
Diabetes	5 (11%)	25 (29%)	23 (43%)	18 (72%)	71 (33.6%)	<0,001
Dyslipidemia	31 (67%)	68 (78%)	30 (57%)	12 (48%)	141 (66.8%)	0,009
Gender (M)	40 (87%)	63 (72%)	47 (89%)	21 (84%)	171 (81%)	0,06
IMC (≥ 30)	7 (15%)	13 (15%)	9 (17%)	7 (28%)	36 (17.1%)	0,48
Age (mean $\pm$ SD)	66 $\pm$ 8	71 $\pm$ 9	66 $\pm$ 9	74 $\pm$ 12	69 $\pm$ 10	0,001
eGFR ^a <30ml/min	0 (0%)	4 (4.6%)	2 (3.8%)	2 (8%)	8 (3.8%)	0,41
eGFR <60ml/min	8 (17.4%)	28 (32.2%)	10 (18.9%)	12 (48%)	59 (27.5%)	0,049

^aeGFR: estimated glomerular filtration rate

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191976.t001>

samples were collected. Altogether, ECLAGEN includes 244 patients (217 atherosclerotic patients and 27 organ donors for healthy arteries), recruited in Nantes from october 2011 to december 2015 (Table 1).

Sample collection and handling was performed in accordance with the guidelines of the medical and ethical committee in Nantes, France, and all patients participating in the study provided written informed consent (research protocol#PFS09-014, authorized on Dec 23, 2009 by the agence de biomédecine). In case of organ donors, the absence of patient opposition to organs donation and an informed and signed consent was required from the patient's family. In all cases the priority was given to the therapeutic harvesting rather the scientific harvesting. Legal and ethical authorizations have been granted by the french research ministry (n°DC-2008-402), the national commission for computerized information and liberties (CNIL, n°1520735 v 0), and the local ethical committee (groupe nantais d'éthique dans le domaine de la santé, GNEDS). For carotid and femoral arteries, endarterectomies were performed on a consecutive series of patients using conventional surgical techniques. For carotid and femoral arteries, the sample was limited to one lesion since endarterectomies were performed. The plaque was removed at the bifurcation from the lumen as a single specimen. For aorta and infra-popliteal arteries, the sample was harvested with the most severe atheromatous lesion seen during the procedure, and surgeons collected a similarly sized sample as carotid and femoral specimens. All samples were 1–2cm long. For histology, we analyzed sections of the core of the lesion present in each arterial sample.

None atheromatous arteries were collected from arterial allograft donors. Sample collection and handling was performed in accordance with the guidelines of the medical and ethical committee in Nantes, France, and all patients or patient's next of kin provided written informed consent.

Exclusion criteria for non-atheromatous arteries and patients were history of cardiovascular diseases (ischemia cardiopathy, stroke, peripheral artery diseases), or presence of macroscopic athero-thrombosis during tissue collection.

Histological and immunological analyses

For histological analysis, the tissue samples were fixed in 10% formalin for 24–48h, decalcified in Sakura TDE 30 fluid for 5 days, and embedded in paraffin. Ten serial sections from the middle of the atherosclerotic lesion were processed. These sections were stained with hematoxylin and eosin (HE, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Grading of lesion types was based on

the updated AHA classification [18]. Immunohistochemistry (IHC) was performed to localize and semi-quantify endothelial cells with CD31 antibody (Dako, Glostrup, Denmark), pericytes with NG2 antibody (Millipore, Billerica, MA, USA), smooth muscle cells with smooth muscle actin- α (α -SMA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and macrophages with CD68 antibody (Immunotech, Marseille, France). For each IHC staining, a negative control excluded the primary antibody. Whole sections were imaged with the NanoZoomer digital slide scanner (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan).

For each patient, the whole slide was scanned. We quantified positive stained area using Image Pro Plus (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) with similar parameters for all samples. Numbers were expressed as a percentage of the stained area over the area of the plaque for each patient, and final results are the mean of the whole cohort. We analyzed the presence of calcification types (sheet like, nodular, clear center/micro calcifications, and osteoid metaplasia) by 2 independent investigators.

Cell isolation, culture and differentiation assays

Fresh tissues are collected, stored in cold PBS for 3–6 hours before processing. We washed the sampled with cold PBS then dissociated non-atheromatous arteries from organ donors with an enzymatic mix including by collagenases (Liberase DL, Roche), elastase (porcine elastase, Sigma-Aldrich) and DNase (DNaseI, Sigma-Aldrich) in High glucose DMEM. A first short digestion step permitted endothelial cell isolation. Then mechanical dissociation followed by a longer incubation with digestion mix allowed smooth muscle cells isolation.

We removed occlusive debris from cell suspension using 7 μ m mesh strainer. Additional centrifugation removed smaller debris and cells were plated in gelatin-coated (1% porcine type B gelatin, Sigma-Aldrich) 12 wells plate (Corning cell bind, Corning) in complete media ECBM2 and SMCBM2 for endothelial cell (EC) and SMC respectively (Promocell, Heidelberg, Germany). In case of EC/SMC mixed populations, we performed an immune-magnetic separation using CD31 beads (anti-human CD31 beads, Thermo Fischer scientific).

The SMCs used in the study were isolated from non-atheromatous arteries of various arterial location of the same organ donors. These medial derived SMCs were used between 3 and 5 passages. Exclusion criteria for non-atheromatous arteries group were history of cardiovascular diseases (ischemia cardiopathy, stroke, peripheral artery diseases), or presence of atherosclerotic lesion during tissue collection. We did not observe medial calcification for these samples by histology, as the sample was divided in separate pieces to perform such analysis.

We repeated the experiments for 5 independent donors (3 males, 2 females), from 18 to 64-year-old (mean 45.8 $\pm$ 7.9). There was no significant difference in age between groups.

SMC were differentiated into osteoblastic cells by adding 1.8–3 mM inorganic phosphate to 3% Fetal Calf Serum (FCS) containing DMEM culture medium, as previously described [19]. SMC differentiation and mineralization was assessed 7–9 days after treatment, using alizarin red staining (Sigma-Aldrich).

Assessment of TGF β Receptor 1 (TGF β R1) signaling activity was evaluated through the levels of phosphorylated smad3. Induction consisted in treating cells with TGF β for 45 minutes. SD208 (2-(5-Chloro-2-fluorophenyl)pteridin-4-yl]pyridin-4-yl-amine, Sigma-Aldrich) was added 1h before TGF treatment. Antibodies for P-smad3 and Smad3 were purchased from Millipore, and vinculin from Cell Signaling Technology.

Gene expression and microarray analysis

Total RNA from SMC was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Inc.). For microarray analysis, RNA was hybridized to Agilent human gene expression microarrays

(G4851C). Fluorescence values corresponding to raw expression data were extracted. Positive and negative control probes were removed. Non-linear effects such as background or saturation were corrected by Lowess [20] against a median profile of all samples [21]. Values of replicate probes were averaged and the data matrix was filtered to 20,000 probes based on highest median expression values. Clusters of co-expressed genes were identified using K-means ($k = 11$) on natural-log-transformed and gene-median-centered data with uncentered correlation as a similarity metric in Gene Cluster 3.0 [22]. The value of k was determined by analyzing the presence of novel phenotype-specific gene clusters after incrementing k (start value $k = 10$). Hierarchical clustering was performed using Gene Cluster 3.0 and heatmaps were displayed using Java Treeview. Clusters separating the different arterial beds were selected and a collective p-value was calculated. For each sample, a mean expression value of all genes was calculated. The mean values of different arterial beds were compared. This strategy based on strong correlation of gene expression allowed us to avoid multitesting. Hierarchical clustering of these clusters demonstrated a great homogeneity.

Microarray data can be found at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=ibwbossexboxzmt&acc=GSE84012>

Gene Ontology enrichment analysis of the different clusters was performed using GoMiner. [23] Enrichment of GO terms were determined using the 20,000 probes list as background. Annotations with $FDR < 0.05$ were considered significant.

For specific gene quantification, total RNAs were also reversed transcribed using the transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche Applied Science). Real-time monitoring of PCR amplification of complementary DNA (cDNA) was performed using DNA primers on CFX96 detector system (Bio-Rad) with SYBR PCR Master Mix (Bio-Rad). Target gene expression was normalized to *HPRT* levels in respective samples as an internal standard, and the comparative cycle threshold (C_t) method was used to calculate relative quantification of target mRNAs: *runt-related transcription factor 2 (RUNX2)* (F-GTGCCTAGGCGCATTTCA/ R-GCTCTTCTTACTGAGAGTGAAG), *osteocalcin (OC)* (F-GGCGCTACCTGTATCAATGG/ R-TCAGCCAACTCGTCACAGTC), *alkaline phosphatase (ALP)* (F-AACACCACCCAGGGGAAC/ R-GGTCACAATGCCACAGATT), *TGFBR1* (F-GCAGACTTAGGACTGGCAGTAAG/ R-AGAAGTTT CAGGGGCCATGT), *SMAD7* (F-TTTCCTCGGACAGCTCAAT/ R-TTTTGTCTCCGACCTTCTG), *SERPINE1* (F-GCTTTTGTGTGCCTGGTAGAAA/ R-TGGCAGGCAGTACAAGAGTGA), *HPRT* (F-TGACCTTGATTTATTTTGCATACC/ R-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT).

Statistics

Variables are displayed as mean $\pm$ SD. Two investigators performed the morphologic observations independently and blindly, without any indication on the arterial bed or patient group. Data were analyzed by the Kruskal–Wallis one-way analysis of variance and Bonferroni post-test for each factor. Population statistics between ECLAGEN groups was analyzed by Fisher's exact test and global ANOVA for age comparison. Statistical analyses were performed using Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). A p-value $< .05$ was considered statistically significant. All in vitro experiments were performed at least 3 times, with 3 independent samples preparations.

Results

Atherosclerosis heterogeneity among vascular beds

We previously reported a drastic difference in plaque composition between carotid and femoral arteries with our first human lesion biocollection ECLA [8,9,11,24]. ECLAGEN biocollection comprises 230 patients. We collected a total of 308 lesions and healthy arteries from

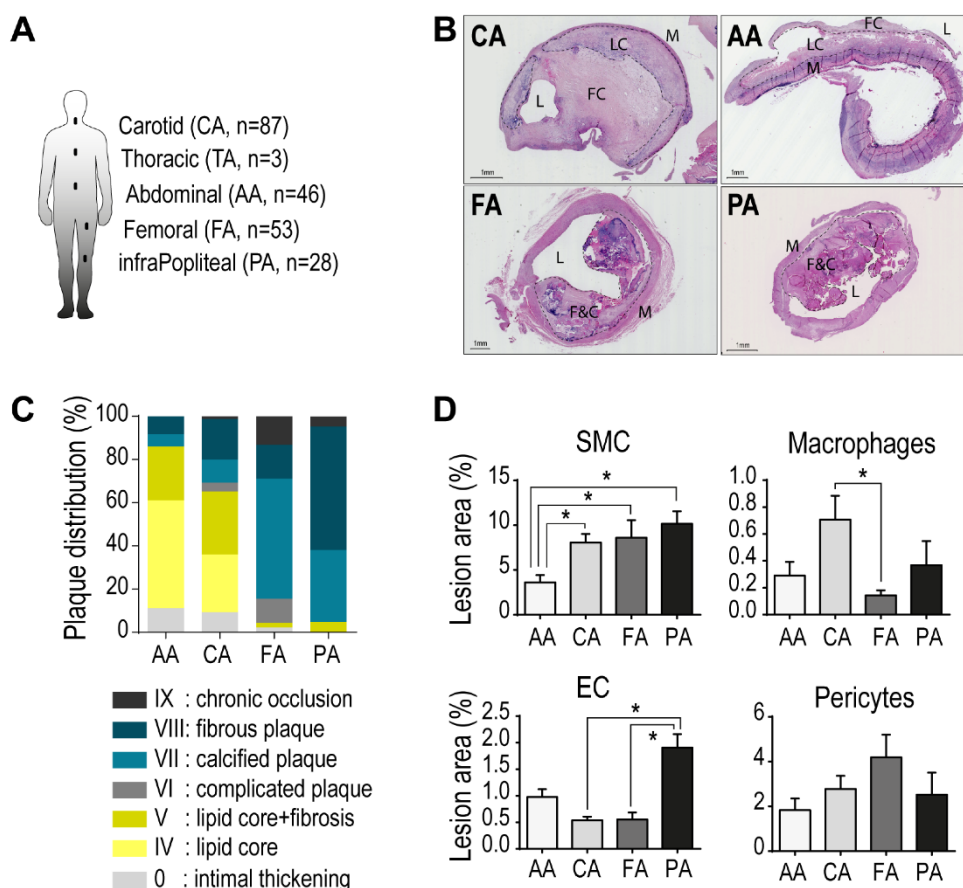


Fig 1. Heterogeneous atherosclerotic lesions among arterial beds. (A) Atherosclerotic lesions from patients (P) and healthy arteries (H) were collected. (B-C) Representative images of hematoxylin/eosin (HE) stained lesions and AHA classification of plaque composition from each arterial location. (D) Quantification of immunohistochemical stainings for endothelial cell, SMC, macrophage, and pericyte in lesions from each arterial bed. Bars represent mean $\pm$ SD (* $p < 0.05$). Lumen (L), Media (M), Lipid core (LC), Fibrous Cap (FC), and Fibrosis and Calcification (F&C).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191976.g001>

abdominal (AA, n = 46/11, patient/healthy) and thoracic aorta (TA, n = 3/19), carotid (CA, n = 87/20), femoral (FA, n = 53/20), and infrapopliteal arteries (PA, n = 28/21) (Fig 1A). Healthy arteries were obtained from healthy organ donors, and multiple locations were collected from the same organ donor for a more reliable comparison (*in vitro* work). The histological characterization of plaque morphometry and composition confirmed specificities in plaque development depending on anatomical location (Fig 1B).

Abdominal and carotid arteries develop predominantly lipid-rich lesions, with a marked presence of lipid core (75% and 56%). Femoral and infrapopliteal arteries exhibit highly fibrotic and/or calcified lesions. Plaques from infrapopliteal arteries are largely fibrotic (57%), but also develop large calcification (33%). Femoral arteries present mostly calcified lesions (56%) and fibrotic lesions (16%). Only scarce lesions with lipid inclusions were found in femoral and infrapopliteal arteries (Fig 1C).

Cellular composition reflected plaque diversity between typical atheromatous carotid lesions, enriched in lipids and with highest macrophage content among vascular beds, and lower limb arteries that develop stenotic lesions with extensive fibrosis, with scarce

macrophage presence. Femoral arteries and infrapopliteal arteries are both associated with increased neoangiogenesis, reflected by a significant increased presence of endothelial cells and pericytes within the diseased intima (Fig 1D).

Plaque heterogeneity among vascular beds correlates with differences in calcification burden

Vascular calcification is a general term that encompasses various forms of mineralized structures. We and others previously identified four main types of intimal calcification in atherosclerotic lesions [9,25]. Clear center/microcalcification—often present in close proximity from lipid-rich core, sheet-like calcification—stratified areas of mineralizing tissue, nodules, and osteoid metaplasia—actual bone structure characterized by the presence of osteoid tissue with the presence of osteocyte-like cells, multinucleated osteoclast-like cells, and a lipid and leucocytes-rich pseudo bone-marrow (Fig 2A) [11,26].

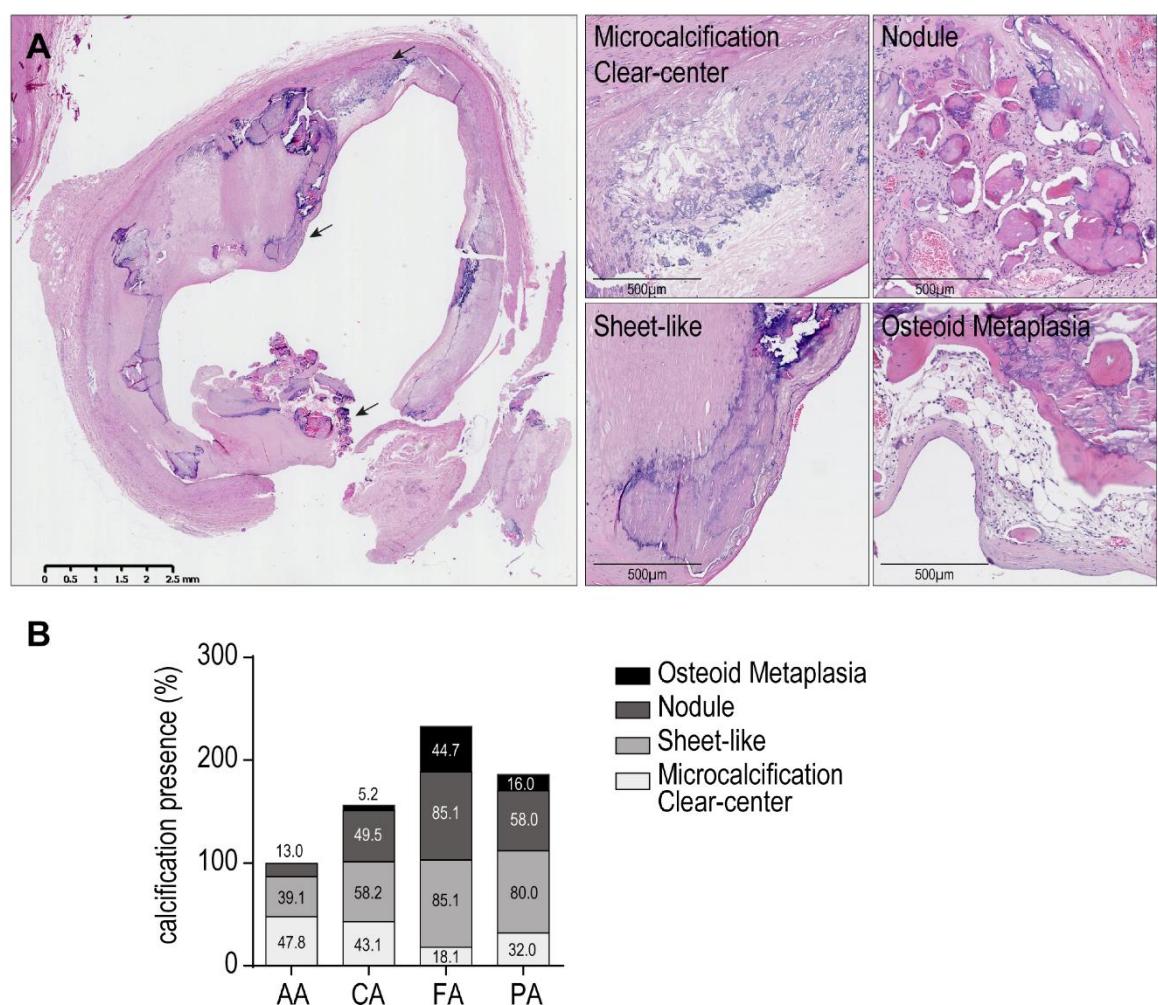


Fig 2. Heterogeneous calcification types among arterial beds included in ECLAGEN biocollection. Atherosclerotic lesions often present multiple calcification types (arrows). (A) Microcalcification/clear center calcification, sheet-like calcification, calcified nodule, osteoid metaplasia. (B) Differential presence of calcification types among lesions from each arterial location. (AA, n = 46; CA, n = 87; FA, n = 53; PA, n = 28).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191976.g002>

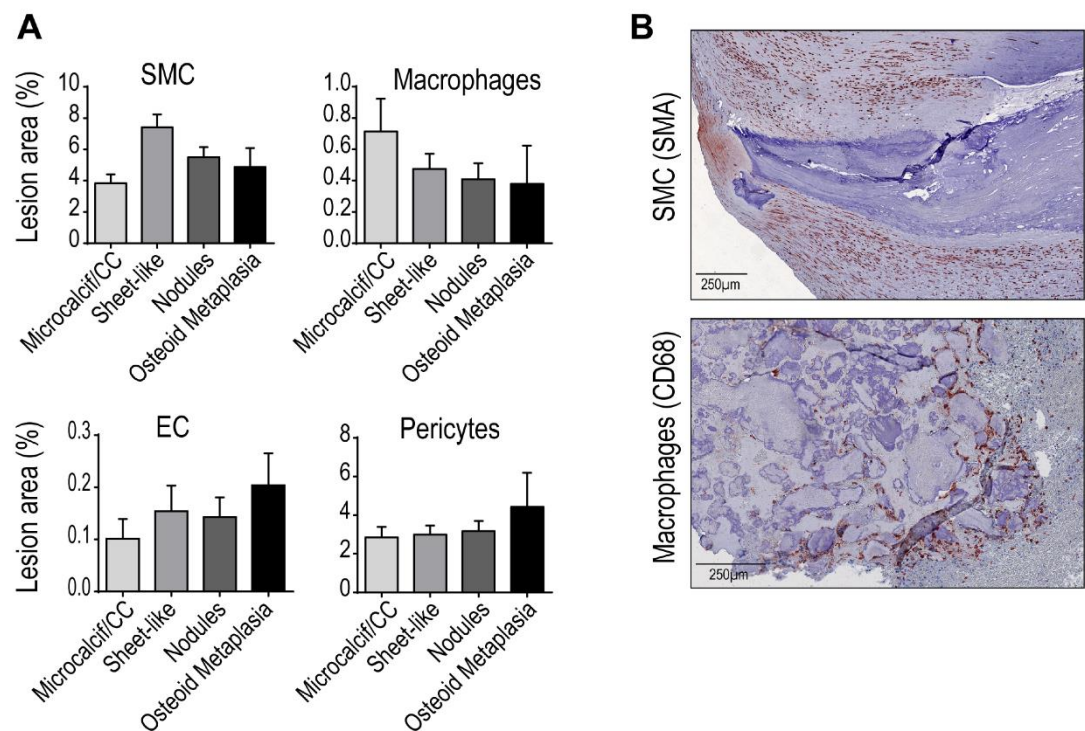


Fig 3. Cell content associated with vascular calcifications. (A) Quantification of endothelial cell, SMC, macrophage, and pericyte content in lesions with given calcification types (AA, n = 46; CA, n = 87; FA, n = 53; PA, n = 28). (B) Representative images illustrating the close proximity of SMC and macrophages with sheet-like and nodular calcifications, respectively. Bars represent mean $\pm$ SEM.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191976.g003>

Only few samples in this cohort were found without any form of calcification (18%). The abdominal aortas present the least calcification burden overall, with mostly lipid-related microcalcification (present in 47.8% of all aortic lesions) and sheet-like calcification (39.1%). Intrapopliteal arteries and femoral are more prone to develop dense and structured calcification compared to aorta and carotid arteries (sheet-like: 85.1% (FA) and 80.0% (PA) vs 39.1% (AA) and 58.2% (CA), and nodules: 85.1% (FA) and 58.0% (PA) vs 13.0% (AA) and 49.5% (CA)).

Femoral arteries are significantly more calcified than any other vascular bed, with a high prevalence of all advanced calcification types, and specifically OM (44.7%), far more frequent in femoral than in carotid (5.2%), aorta (0%) or intrapopliteal arteries (16.0%). This calcification heterogeneity, together with plaque composition, suggests that specific local environment or/and molecular determinants orient plaque development and calcification formation depending on the anatomical location.

To assess whether predominant atheromatous cell types (macrophage, smooth muscle cell, endothelial cell, and pericyte) could play a direct role in each calcification types formation and evolution, we evaluated their quantitative and qualitative association (S1 Fig).

Quantitative analysis for each staining did not reach any significant difference in SMC, macrophage, EC and pericytes with any calcification type (Fig 3A). Many of the lesions analyzed presented several types of calcification, which makes the quantitative analysis difficult to interpret at the whole lesion level. We observed a trend towards a quantitative association between SMC with sheet-like, and EC/pericytes with OM, as in our previous study [8]. We

better estimated the link between cell and calcification types by analyzing their spatial proximity. Sheet-like predominantly develop and emerge from SMC-rich fibrotic parts of the lesions, while macrophages are often found in close proximity or direct contact with calcified nodules, suggesting a direct implication of these cell types in their respective formation (Fig 3B).

SMC from none atheromatous femoral arteries are more prone to mineralization

Among atheromatous cells, SMCs are a prominent active player in vascular calcification due to their mineralizing properties when subjected to a pro-osteogenic milieu. The close localization of SMCs to sheet-like calcifications in plaques and to medial calcification in chronic kidney disease (CKD) patients further advocates for a direct role of SMC in plaque mineralization. To assess the contribution of SMC in vascular calcification heterogeneity among vascular beds, we isolated primary medial SMC from healthy abdominal and thoracic aorta, carotid, femoral and infrapopliteal arteries from given non-atherosclerotic organ donors. We induced cell mineralization in presence of 1.2–3.0mM inorganic phosphate in culture medium for 7 days. Our own primary SMCs showed similar mineralizing capacities as commercial SMC, with no difference in cell viability (Fig 4A).

We cultivated SMC from the 5 healthy arterial locations for 7 days in osteogenic condition. The results shown in Fig 4B indicate that SMC from femoral arteries mineralize 39.8% more than infrapopliteal arteries, and than other vascular beds (66.5% vs CA, 57.0% vs TA, and 88.9% vs AA). Differential ability to mineralize was also reflected by a marked increase in osteoblastic marker expression (runx2, alkaline phosphatase, osteopontin) in femoral SMC compared to other arterial beds (Fig 4C). SMC mineralization capacities correlated with the extent of plaque calcification observed in patient lesions, suggesting that specific propensities among SMC to mineralize could directly contribute to atheromatous calcification heterogeneity in peripheral arteries.

SMC from peripheral arteries express specific transcriptomic signatures

Vascular calcification heterogeneity among vascular beds could either derive from local micro-environmental specificities and or reflect molecular singularities between arterial beds. To analyze these differences and identify key molecules involved in this process, we performed a transcriptomic microarray analysis with medial SMCs isolated from the 5 healthy peripheral arterial beds indicated above (from 54 and 64-year-old organ donors) (S1 File).

K-means analysis of the microarray data identified several gene clusters with arterial bed(s) specific expression profiles (Fig 5).

Incrementing k from 10 to 11 revealed the presence of an FA-specific gene cluster (cluster 10). Further increasing k to 12 or 13 did not reveal any novel phenotype-specific gene clusters. Therefore, k was fixed at 11. Two clusters were selected because of striking differential expression levels between FA/PA and AA/TA/CA arterial beds (cluster 6 (2437 probes) and cluster 7 (2846 probes)). Two additional clusters were selected because of an FA-specific gene expression profile (cluster 3 (1748 probes) and cluster 10 (1679 probes)). Functional annotation analysis showed that genes downregulated in FA/PA vs. AA/TA/CA arterial beds (cluster 6) were mostly involved in endocrine system development, translational termination, macromolecular complex disassembly and antigen processing and presentation. Enriched annotations among the upregulated genes (cluster 7) included functions related to intracellular transport and protein localization. Genes highly expressed in the FA arterial bed only (cluster 3) were notably involved in cellular carbohydrate metabolic processes. Genes downregulated in the FA arterial

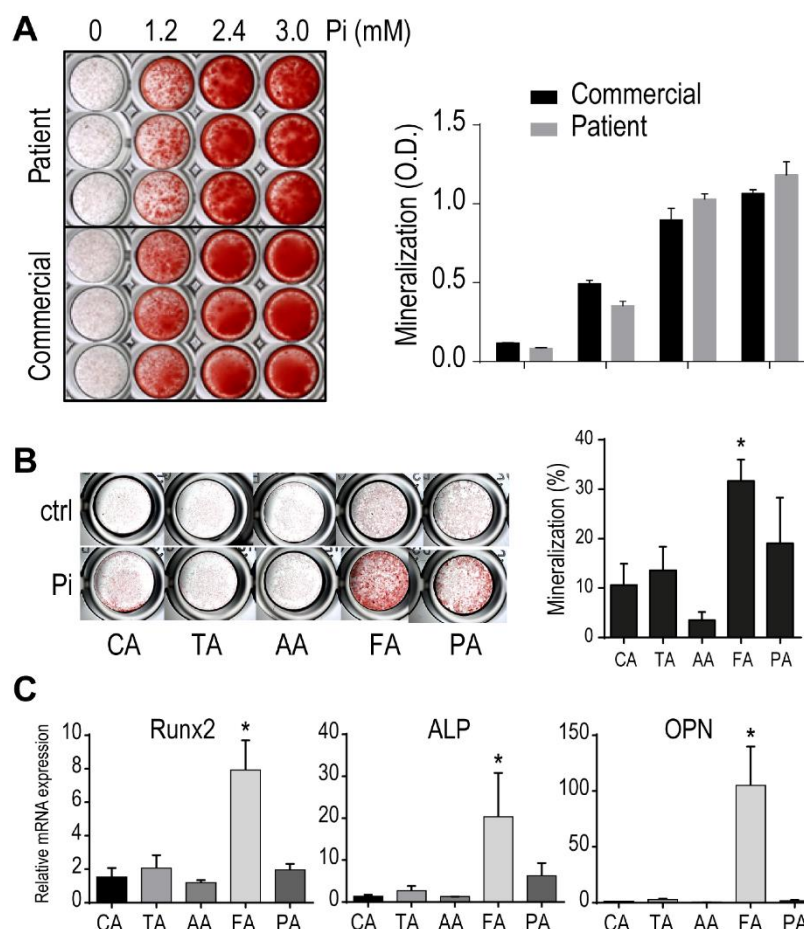


Fig 4. Differential mineralization properties of SMC depending on their anatomical origin. (A) Mineralization of commercial and SMC isolated from healthy thoracic aorta (ECLAGEN sample) 10 days after treatment with indicated concentrations of inorganic phosphate. (B) Mineralization after 7 days of SMCs isolated from each healthy anatomical location, in presence of 2.4 mM inorganic phosphate (mineralized area in %). (C) Differential expression of osteoblastic markers Runx2, ALP and OPN in SMCs from different arterial beds. Bars represent mean $\pm$ SD. (* $p < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191976.g004>

bed vs. all others (cluster 10) were involved in the immune response. This gene cluster also contained genes involved in ossification and lipid localization.

As femoral arteries are more prone to mineralize, we screened for important signaling pathways linked to osteoblastic differentiation and tissue mineralization in cluster 3 and 10. Among the genes specifically overexpressed or absent in FA compared to other vascular beds, we found that 19 members of TGF β signaling.

This suggests that TGF β signaling might play a role in the differential mineralization capacities of SMC depending on their anatomical origin.

Differential TGF β signaling in SMC from different arterial beds accounts for SMC mineralization heterogeneity

Gene screening from transcriptomic analysis led to the identification of TGF β signaling, specifically upregulated in femoral arteries. Individual qPCR analysis confirmed elevated levels of

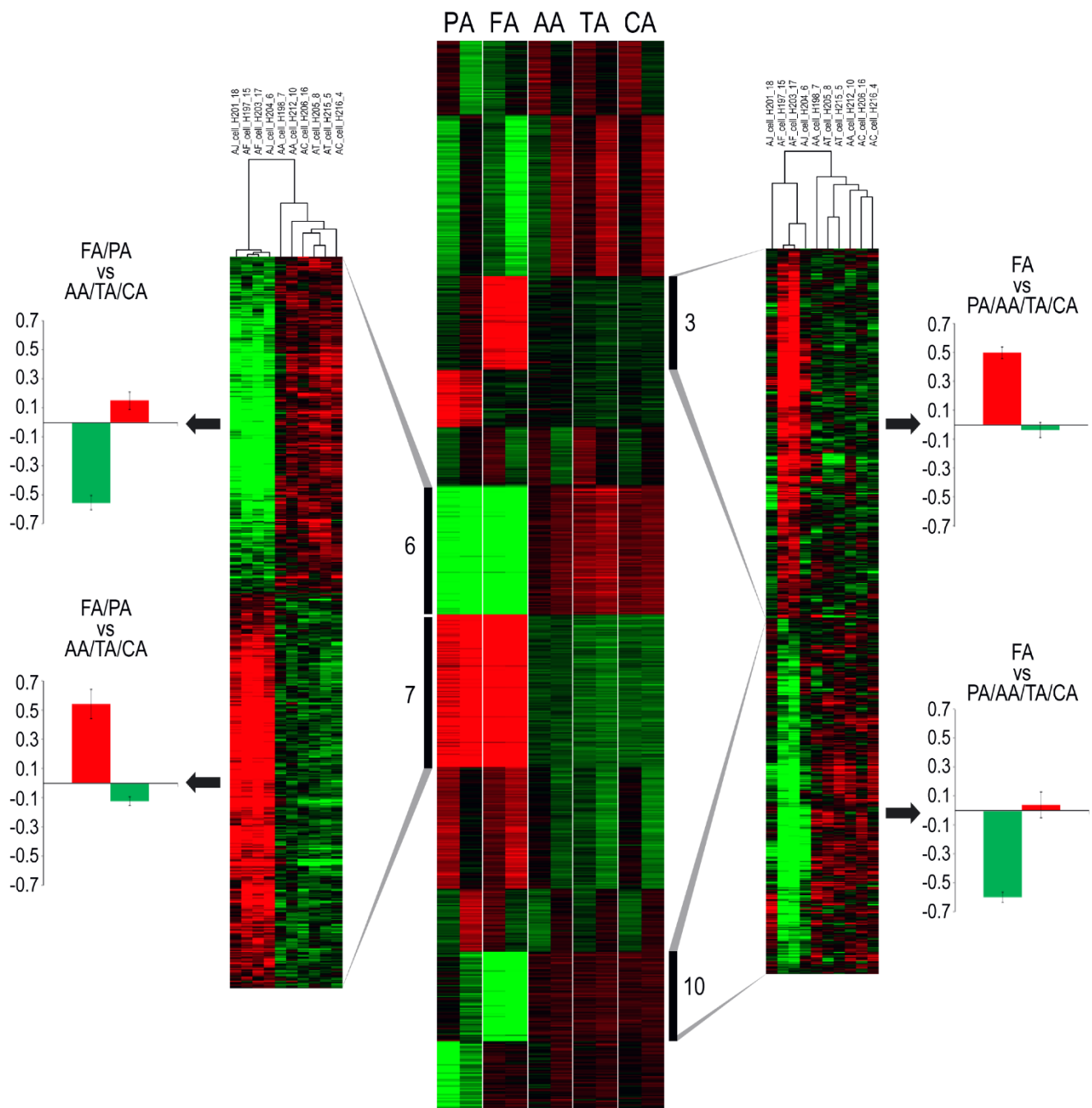


Fig 5. Transcriptomic heterogeneity of SMCs originating from distinct arterial locations. Gene expression is presented as a colored matrix where each row represents a gene and each column a sample. Green, black and red correspond to lower values, median values and higher values, respectively. Middle: Transcriptome data clustered by K-means (with $k = 11$). Clusters 6 and 7 (hierarchical clustering shown on the left) clearly separate FA/PA and AA/TA/CA arterial beds. Clusters 3 and 10 (hierarchical clustering shown on the right) display an FA-specific gene expression profile. Extreme left and right: For each sample, the average of all probes was calculated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191976.g005>

TGF β R1 in femoral SMC, compared to infrapopliteal arteries (2.7 fold), carotid (70.5 fold), and aorta (49 fold). Additional TGF β signaling related molecules (smad7, serpine, bambi) have been found differentially expressed in femoral and infrapopliteal arteries compared to other arterial beds (Fig 6A).

We confirmed higher basal and induced TGF β R1 signaling in femoral-derived SMC compared to carotid-derived cells, through the increased presence of phosphorylated smad3 (Fig 6B).

Because TGF β has been already reported in cell mineralization process and vascular cell transdifferentiation in osteoblast-like cells [27–29], we postulated that high propensity of femoral cells to mineralize could derive from an increase presence of TGF β signaling. To assess this question, we treated femoral and carotid arterial SMC with TGF β signaling inhibitor SD208 while inducing osteoblastic differentiation with high inorganic phosphate medium. Fig 6C and 6E show that TGF β blockade with SD208 at 1 and 2.5 μ M or targeted siRNA was sufficient to efficiently prevent femoral cells mineralization, but not for carotid SMC, confirming a specific role of TGF β signaling in SMC mineralization in an anatomical dependent manner.

Discussion

Our work further explores the differential development of atherosclerosis among vascular beds and suggests potential clinical implications. A better understanding of the mechanisms regulating plaque development and evolution towards a typical lipid-rich inflamed vulnerable lesion, a fibrous, or a highly calcified plaque could lead to new therapeutic strategies for preventing acute athero-thrombotic events.

We and others have previously reported that carotid and femoral arteries develop very different lesion types [9,30]. While exposed to the same cardiovascular risks, carotid arteries predominantly present classical atheromatous lesions, and femoral arteries develop fibro-calcic lesions. Our present study, that includes additional vascular beds, confirmed and extended this plaque heterogeneity characterization. Infrapopliteal arteries, anatomically close to the femoral bed, show similarly fibrotic and calcified lesions. Sheet-like calcifications (found in the media of chronic kidney diseases) are the predominant form of plaque mineralization in infrapopliteal arteries, with limited presence of microcalcifications, nodules and bone tissue, the latter being found almost exclusively in femoral arteries. Carotid lesions develop all kinds of calcification, compared to the aorta that seems overall less prone to mineralize.

Our observations strongly suggest that microcalcification derive from the lipid-rich, necrotic core in inflamed lesions, supporting a role of apoptosis and necrosis in early calcification events, as previously reported [31,32]. The more structured calcifications do not quantitatively correlate with SMC, macrophages or EC content within the lesion, but qualitative analysis indicates that sheet-like calcifications develop in close proximity of SMC-rich areas, and macrophages often associate with calcified nodules. This observation further supports the contributing role of SMC and macrophages in vascular calcification. SMCs are believed to play an active role in plaque mineralization through their release of calcifying matrix vesicles and their osteogenic differentiation ability [33–35]. Macrophages have also been reported to play a supportive role in plaque mineralization through the release of matrix vesicles and by their lineage with osteoclastic cells [36–38]. A more thorough histological with multiple co-stainings would attest the real phenotype of macrophages and smooth muscle cells present in each lesion, as CD68 and SMA can be also expressed at lesser levels by other myeloid and mesenchymal-derived cell types, respectively, and with respect with recent work suggesting that SMC could even transdifferentiate into macrophage-like cells [39].

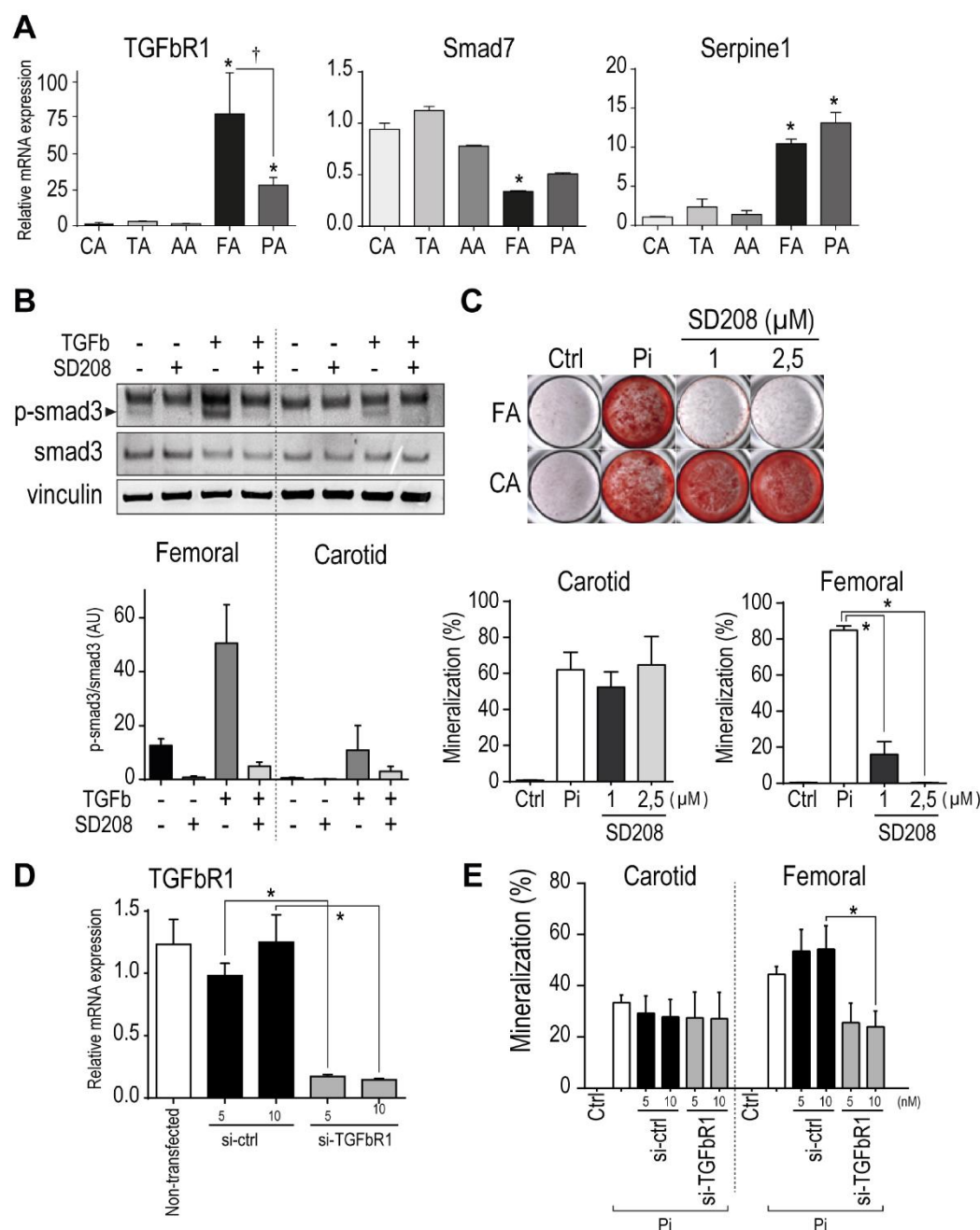


Fig 6. Functional implication of TGFβ signaling in SMC mineralization heterogeneity. (A) Relative mRNA expression level of TGFβR1, Smad7 and Serpine1 in resting SMCs from each arterial bed. (B) Basal and induced phosphorylation of TGFβR1 effector protein smad3 in presence or absence of TGFβR1 inhibitor SD208 (1μM). (C) Mineralization of SMCs from carotid and femoral arteries in presence of inorganic Phosphate (2.4mM) and SD208 for 9 days. (D) TGFβR1 expression knockdown in SMC 48hrs post-transfection. (E) Mineralization of SMCs from carotid and femoral arteries after TGFβR1 knockdown in presence of inorganic Phosphate (2.4mM) 7 days. Bars represent mean ± SEM. (*p<0.05).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191976.g006>

The quantitative analysis failed to illustrate these associations, because most of the lesions exhibit several types of calcification. The discrepancies among calcification types (localization, morphology, associated lesions and territories) strongly suggest that specific mechanisms may regulate their formation and development. Direct and systematic chronological link between microcalcification, sheet-like, nodule and OM seems unlikely, based on the drastic difference in associated plaque composition. This critical question remains unexplored due to the lack of technological imaging modality capable of detecting and following up each calcification form over time in given lesions.

One limitation of such study also remains that diseased specimens from each vascular bed was obtained from different patients, and other vascular beds cannot be analyzed besides those operated upon.

Calcification and plaque composition heterogeneity among vascular beds could derive from specific local microenvironmental (e.g. hemodynamics), intrinsic biological singularities that orient and regulate plaque evolution and mineralization, or both. Clinical data analysis did not show any significant impact of common cardiovascular risk factors (age, sex, diabetes, dyslipidemia) with calcification, all types included, nor with any given calcification type. Sulkava *et al* recently confirmed plaque heterogeneity among vascular beds at transcriptomic levels [40]. Our results show SMC heterogeneity among vascular beds, with marked specific transcriptomic signatures between lower (femoral and infrapopliteal arteries), and upper body (aorta and carotid arteries), even several months of culture following isolation from healthy arteries. Our results provide molecular evidence that SMC differ between arterial beds. The differential expression of numerous developmental genes in our transcriptomic analysis may reflect their different embryonic origins [41,42], and is reflected by SMC heterogeneity [43].

TGF β signaling plays a critical role in atherosclerosis, with important contribution many aspects of the disease (hyperlipidemia, hypertension, immunomodulation, thrombosis, and vascular remodeling). TGF β is in particular a key regulator of SMC phenotypic switch leading to SMC migration, proliferation, matrix production, but also mineralization [29,44,45]. Our transcriptomic analysis indicates a marked difference in basal TGF β signaling or TGF β sensitivity in arterial beds. Overexpression of TGF β R1 in femoral arteries is likely to favor SMC switch, mineralization, and hence calcification. In addition to specific local microenvironment, the marked vascular cell (SMC, EC) heterogeneity demonstrated by our transcriptomic analysis and other reports, is a key element to better understand plaque biology and development.

Supporting information

S1 Fig. Plaque Heterogeneity among vascular beds. Representative images of Hematoxylin/Eosin (HE) and Masson's Trichrome colorations, and immuno-histochemical staining for endothelial cell (CD31, brown), SMC (α -smooth muscle actin, red), and macrophage (CD68, brown). Lumen (L), Media (M), Lipid core (LC), Fibrous Cap (FC), and Fibrosis and Calcification (F&C). Quantitative analysis was performed within the lesion as indicated by the dotted line.
(TIF)

S1 File. Microarray analysis between SMCs isolated from healthy arterial beds. Values of replicate probes for 20k genes based on highest median expression values (Significance analysis of microarrays (SAM) analysis).
(XLSX)

Acknowledgments

We thank Carine Montagne, Flavien Gautron, and Manon Pondjikli in charge of the biocollection. We are most grateful to the GenoBIRD core facility for its technical support.

Author Contributions

Conceptualization: Dominique Heymann, Yann Gouëffic, Thibaut Quillard.

Data curation: Olivier Espitia, Mathias Chatelais, Marja Steenman, Céline Charrier, Steven Georges, Thibaut Quillard.

Formal analysis: Olivier Espitia, Mathias Chatelais, Marja Steenman, Rémi Houlgatte, Thibaut Quillard.

Funding acquisition: Marja Steenman, Rémi Houlgatte, Dominique Heymann, Yann Gouëffic, Thibaut Quillard.

Investigation: Olivier Espitia, Mathias Chatelais, Thibaut Quillard.

Methodology: Marja Steenman, Franck Verrecchia, Yann Gouëffic, Thibaut Quillard.

Project administration: Dominique Heymann, Yann Gouëffic.

Resources: Franck Verrecchia, Yann Gouëffic.

Supervision: Benjamin Ory, François Lamoureux, Dominique Heymann, Yann Gouëffic, Thibaut Quillard.

Validation: Franck Verrecchia.

Visualization: Marja Steenman, Thibaut Quillard.

Writing – original draft: Thibaut Quillard.

Writing – review & editing: Marja Steenman, Blandine Maurel, Steven Georges, Benjamin Ory, François Lamoureux, Dominique Heymann, Yann Gouëffic, Thibaut Quillard.

References

1. Murray CJ, Lopez AD (2013) Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med* 369: 448–457. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1201534> PMID: 23902484
2. Maldonado N, Kelly-Arnold A, Vengrenyuk Y, Laudier D, Fallon JT, Virmani R, et al. (2012) A mechanistic analysis of the role of microcalcifications in atherosclerotic plaque stability: potential implications for plaque rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303: H619–628. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00036.2012> PMID: 22777419
3. Maldonado N, Kelly-Arnold A, Cardoso L, Weinbaum S (2013) The explosive growth of small voids in vulnerable cap rupture: cavitation and interfacial debonding. *J Biomech* 46: 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.10.040> PMID: 23218838
4. Kelly-Arnold A, Maldonado N, Laudier D, Aikawa E, Cardoso L, Weinbaum S (2013) Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 10741–10746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308814110> PMID: 23733926
5. Joly L, Mandry D, Verger A, Labat C, Watta G, Roux V, et al. (2016) Influence of Thoracic Aortic Inflammation and Calcifications on Arterial Stiffness and Cardiac Function in Older Subjects. *J Nutr Health Aging* 20: 347–354. <https://doi.org/10.1007/s12603-015-0574-0> PMID: 26892585
6. Pikilidou M, Yavropoulou M, Antoniou M, Yovos J (2015) The Contribution of Osteoprogenitor Cells to Arterial Stiffness and Hypertension. *J Vasc Res* 52: 32–40. <https://doi.org/10.1159/000381098> PMID: 25925498
7. Thomas IC, Ratigan AR, Rifkin DE, Ix JH, Criqui MH, Budoff MJ, et al. (2016) The association of renal artery calcification with hypertension in community-living individuals: the multiethnic study of atherosclerosis. *J Am Soc Hypertens* 10: 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2015.12.003> PMID: 26796664

8. Davaine JM, Quillard T, Brion R, Laperine O, Guyomarch B, Merlini T, et al. (2014) Osteoprotegerin, pericytes and bone-like vascular calcification are associated with carotid plaque stability. *PLoS One* 9: e107642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107642> PMID: 25259713
9. Herisson F, Heymann MF, Chetiveaux M, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, et al. (2011) Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis* 216: 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.004> PMID: 21367420
10. Goueffic Y, Davaine JM, Merlini T, Rimbert A, Herisson F, Heymann MF, et al. (2013) [Arterial heterogeneity]. *Rev Med Interne* 34: 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2012.10.364> PMID: 23159822
11. Davaine JM, Quillard T, Chatelais M, Guilbaud F, Brion R, Guyomarch B, et al. (2015) Bone Like Arterial Calcification in Femoral Atherosclerotic Lesions: Prevalence and Role of Osteoprotegerin and Pericytes. *Eur J Vasc Endovasc Surg*.
12. Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Bostrom K, et al. (2003) Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 108: 2505–2510. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000096485.64373.C5> PMID: 14581408
13. Dayoub S, Devlin H, Sloan P (2003) Evidence for the formation of metaplastic bone from pericytes in calcifying fibroblastic granuloma. *J Oral Pathol Med* 32: 232–236. PMID: 12653863
14. Hutcheson JD, Goettsch C, Bertazzo S, Maldonado N, Ruiz JL, Goh W, et al. (2016) Genesis and growth of extracellular-vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques. *Nat Mater* 15: 335–343. <https://doi.org/10.1038/nmat4519> PMID: 26752654
15. Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, Zheng Y, Davidson SM, Soong D, et al. (2015) Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res* 116: 1312–1323. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305012> PMID: 25711438
16. Garimella R, Bi X, Camacho N, Sipe JB, Anderson HC (2004) Primary culture of rat growth plate chondrocytes: an in vitro model of growth plate histotype, matrix vesicle biogenesis and mineralization. *Bone* 34: 961–970. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.02.010> PMID: 15193542
17. Otsuka F, Sakakura K, Yahagi K, Joner M, Virmani R (2014) Has our understanding of calcification in human coronary atherosclerosis progressed? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 724–736. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302642> PMID: 24558104
18. Stary HC (2000) Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1177–1178. PMID: 10807728
19. Li X, Yang HY, Giachelli CM (2008) BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 199: 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.031> PMID: 18179800
20. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, et al. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30: e15. PMID: 11842121
21. Baron D, Dubois E, Bihouee A, Teusan R, Steenman M, Jourdon P, et al. (2011) Meta-analysis of muscle transcriptome data using the MADMuscle database reveals biologically relevant gene patterns. *BMC Genomics* 12: 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-113> PMID: 21324190
22. de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S (2004) Open source clustering software. *Bioinformatics* 20: 1453–1454. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth078> PMID: 14871861
23. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556> PMID: 10802651
24. Heymann MF, Herisson F, Davaine JM, Charrier C, Battaglia S, Passuti N, et al. (2012) Role of the OPG/RANK/RANKL triad in calcifications of the atheromatous plaques: comparison between carotid and femoral beds. *Cytokine* 58: 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.02.004> PMID: 22402034
25. Yahagi K, Kolodgie FD, Otsuka F, Finn AV, Davis HR, Joner M, et al. (2016) Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 13: 79–98. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.164> PMID: 26503410
26. Han KH, Hennigar RA, O'Neill WC (2015) The association of bone and osteoclasts with vascular calcification. *Vasc Med* 20: 527–533. <https://doi.org/10.1177/1358863X15597076> PMID: 26324151
27. Beazley KE, Nurminsky D, Lima F, Gandhi C, Nurminskaya MV (2015) Wnt16 attenuates TGFβ-induced chondrogenic transformation in vascular smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35: 573–579. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304393> PMID: 25614285
28. Liu D, Cui W, Liu B, Hu H, Liu J, Xie R, et al. (2014) Atorvastatin protects vascular smooth muscle cells from TGF-β1-stimulated calcification by inducing autophagy via suppression of the beta-catenin pathway. *Cell Physiol Biochem* 33: 129–141. <https://doi.org/10.1159/000356656> PMID: 24481040

29. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL (1994) TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 93: 2106–2113. <https://doi.org/10.1172/JCI117205> PMID: 8182141
30. Dalager S, Paaske WP, Kristensen IB, Laurberg JM, Falk E (2007) Artery-related differences in atherosclerosis expression: implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke* 38: 2698–2705. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.486480> PMID: 17761918
31. Fujita H, Yamamoto M, Ogino T, Kobuchi H, Ohmoto N, Aoyama E, et al. (2014) Necrotic and apoptotic cells serve as nuclei for calcification on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biochem Funct* 32: 77–86. <https://doi.org/10.1002/cbf.2974> PMID: 23657822
32. Clarke MC, Littlewood TD, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, et al. (2008) Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ Res* 102: 1529–1538. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.175976> PMID: 18497329
33. Lee K, Kim H, Jeong D (2014) Microtubule stabilization attenuates vascular calcification through the inhibition of osteogenic signaling and matrix vesicle release. *Biochem Biophys Res Commun* 451: 436–441. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.007> PMID: 25111813
34. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL (2000) Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 87: 1055–1062. PMID: 11090552
35. Shroff RC, Shanahan CM (2007) The vascular biology of calcification. *Semin Dial* 20: 103–109. <https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2007.00255.x> PMID: 17374082
36. Chen Q, Bei JJ, Liu C, Feng SB, Zhao WB, Zhou Z, et al. (2016) HMGB1 Induces Secretion of Matrix Vesicles by Macrophages to Enhance Ectopic Mineralization. *PLoS One* 11: e0156686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156686> PMID: 27243975
37. New SE, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, et al. (2013) Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 113: 72–77. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301036> PMID: 23616621
38. Lee B, Iwaniec UT, Turner RT, Lin YW, Clarke BL, Gingery A, et al. (2017) RIP140 in monocytes/macrophages regulates osteoclast differentiation and bone homeostasis. *JCI Insight* 2: e90517. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90517> PMID: 28405613
39. Feil S, Fehrenbacher B, Lukowski R, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Schaller M, et al. (2014) Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circ Res* 115: 662–667. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304634> PMID: 25070003
40. Sulkava M, Raitoharju E, Levula M, Seppala I, Lyytikainen LP, Mennander A, et al. (2017) Differentially expressed genes and canonical pathway expression in human atherosclerotic plaques—Tampere Vascular Study. *Sci Rep* 7: 41483. <https://doi.org/10.1038/srep41483> PMID: 28128285
41. Majesky MW (2003) Vascular smooth muscle diversity: insights from developmental biology. *Curr Atheroscler Rep* 5: 208–213. PMID: 12667434
42. Leroux-Berger M, Queguiner I, Maciel TT, Ho A, Relaix F, Kempf H (2011) Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin. *J Bone Miner Res* 26: 1543–1553. <https://doi.org/10.1002/jbmr.382> PMID: 21425330
43. Yoshida T, Owens GK (2005) Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ Res* 96: 280–291. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000155951.62152.2e> PMID: 15718508
44. Schmidt A, Lorkowski S, Seidler D, Breithardt G, Buddecke E (2006) TGF-beta1 generates a specific multicomponent extracellular matrix in human coronary SMC. *Eur J Clin Invest* 36: 473–482. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2006.01658.x> PMID: 16796604
45. Gonzalez-Ramos M, Calleros L, Lopez-Ongil S, Raach V, Griera M, Rodriguez-Puyol M, et al. (2013) HSP70 increases extracellular matrix production by human vascular smooth muscle through TGF-beta1 up-regulation. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 232–242. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.10.001> PMID: 23084979

3. Impact des Facteurs de risque cardiovasculaire sur les calcifications et différences génomiques entre artères athérosclérotiques et artères saines issues de différents territoires périphériques

Dans ce second travail nous avons voulu évaluer les associations potentielles entre les facteurs de risque cardiovasculaire et les différents types de calcifications. Comme précédemment décrit dans la littérature, nous avons d'abord confirmé que les facteurs de risque étaient associés à différentes atteintes athéromateuses selon les territoires. Dans cette étude, le tabac était significativement associé aux lésions fémorales, le diabète aux lésions infra-poplitées, et la dyslipidémie aux lésions carotidiennes. Les calcifications artérielles, en analyse multivariée, étaient plus fréquentes chez les sujets âgés, en présence d'hypertension et dans les territoires fémoraux et infra-poplités. Il n'existe cependant pas d'association significative entre les différents types de calcifications et les facteurs de risque cardiovasculaire classiques (âge, tabac, diabète, hypertension, genre, insuffisance rénale, dyslipidémie et obésité).

L'étude transcriptomique par des puces à ADN de 166 échantillons de la biocollection ECLAGEN par une analyse de K means a permis de ségréger les artères selon leur origine anatomique que ce soit pour les artères saines ou les artères présentant des lésions d'athérosclérose. Ces différences d'expressions respectives entre territoire font suspecter une hétérogénéité biologique intrinsèque des lits artériels. Certains clusters comprenant des gènes en lien avec la réponse immunitaire, le stockage lipidique, les fonctions lysosomales ou la résorption osseuse sont surexprimés dans les carotides pathologiques alors que certains clusters de gènes en relation avec la matrice extracellulaire, l'angiogenèse, la prolifération des ostéoblastes, la régionalisation, la contraction musculaire ou la morphogenèse de l'os enchondrale sont surexprimés au niveau des artères fémorales et infra-poplitées pathologiques.

Si l'on regroupe les différents clusters de gènes différentiellement exprimés en grandes fonctions physiologiques, nous avons mis en évidence au niveau des carotides athérosclérotiques une surexpression de la signalisation de l'IL1 β (inflammation), du système de présentation de l'antigène CMH de classe II, de la prolifération leucocytaire, des réponses cellulaires un stimulus. Les artères fémorales quant à elles sont associées aux fonctions du

développement osseux, de la jonction cellulaire, de la contraction cellulaire et la voie signalisation Wnt.

L'expression différentielle des gènes seuls associés au contrôle et à la régulation des calcifications est suffisante pour regrouper les artères selon les territoires anatomiques.

Ces différences suggèrent donc que les spécificités biologiques des artères saines pourraient prédisposer au développement de types de plaques particuliers et ainsi au développement de types de calcification particuliers (ex microcalcification et ossification).

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Identification of genomic differences among peripheral arterial beds in atherosclerotic and healthy arteries

Marja Steenman^{1,2}, Olivier Espitia^{1,3}, Blandine Maurel^{1,4}, Beatrice Guyomarch², Marie-Françoise Heymann⁸, Marc-Antoine Pistorius³, Benjamin Ory¹, Dominique Heymann^{7,8}, Rémi Houlgatte^{5,6}, Yann Gouëffic^{1,4} & Thibaut Quillard¹

Calcification is independently associated with cardiovascular events and morbidity. The calcification burden in atherosclerotic lesions quantitatively and qualitatively differs between arterial beds. Cardiovascular risk factors (CVRF) differentially affect plaque development between arterial beds. The aim of this study was to evaluate the impact of CVRF on atherosclerotic plaque calcification and to further study the molecular arterial heterogeneity that could account for these differences. Histological analysis was performed on atherosclerotic plaques from 153 carotid, 97 femoral and 28 infrapopliteal arteries. CVRF showed minor associations with plaque calcification: age and hypertension affected only the overall presence of calcification but not the type of the calcification, which significantly differed between arterial beds. Transcriptome analysis revealed distinct gene expression profiles associated with each territory in atherosclerotic and healthy arteries. Canonical pathway analysis showed the preferential involvement of immune system-related processes in both atherosclerotic and healthy carotid arteries. Bone development-related genes were among those mostly enriched in atherosclerotic and healthy femoral arteries, which are more prone to developing endochondral calcification. This study highlights the heterogeneous nature of arteries from different peripheral vascular beds and contributes to a better understanding of atherosclerosis formation and evolution.

Vascular calcification is an independent predicting factor for cardiovascular events and morbidity¹. Vascular calcification is associated with a worse prognosis after lower limb artery endovascular revascularization: multivariate analysis reported that the percentage of calcified plaque is an independent predictor of binary restenosis at 12 months². Vascular calcification favors plaque rupture and contributes to hypertension depending on its localization and extent.

Anatomico-histological studies have shown that atherosclerotic plaque compositions largely differ between anatomical locations in peripheral arterial diseases (PAD). Plaque calcifications are heterogeneous with various types of calcifications, including predominantly microcalcifications in carotid arteries (CA) and bone tissue (osteoid metaplasia) in femoral arteries (FA)^{3,4}. These differences do not derive from distinct stages of plaque progression, as femoral plaques tend to develop later than those in CA⁵. The discrepancies in calcification burden could therefore derive from different shear stress conditions⁶, intrinsic biological differences between vascular cells as suggested by their diverse embryological origins^{7,8}, or exposure to different cardiovascular risk factors (CVRF), as CVRF also differentially affect plaque development differentially between arterial beds^{9–12}.

¹UMR1238 INSERM, Université de Nantes, CHU de Nantes, Nantes, France. ²l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France. ³Department of Internal Medicine, CHU de Nantes, Nantes, France. ⁴Department of Vascular Surgery, CHU de Nantes, Nantes, France. ⁵INSERM U1256, NGERE, University of Nancy, Nancy, France. ⁶DRCL, University Hospital of Nancy, Nancy, France. ⁷Department of Oncology and Metabolism, University of Sheffield, INSERM, European Associated Laboratory "Sarcoma Research Unit", Sheffield, UK. ⁸Institut de Cancérologie de l'Ouest, INSERM, U1232, Université de Nantes, Nantes, France. Marja Steenman and Olivier Espitia contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.Q. (email: thibaut.quillard@univ-nantes.fr)

The CVRF for PAD mirror those of cerebrovascular and coronary atherosclerosis, including a positive family history, diabetes mellitus, smoking, chronic kidney disease, hypertension, dyslipidemia and age^{12–18}. Smoking and diabetes are particularly virulent and are independently associated with worse outcomes¹⁹. The influence of CVRF on atherosclerotic localization is well known^{9–11} with a strong relationship between smoking or dyslipidemia, whereas diabetes appears more specific to below the knee disease¹¹ and hypertension favors intracranial atherosclerosis⁹.

The differential impact of systemic CVRF on vascular beds and differential atherosclerotic plaque calcifications and compositions suggest biological arterial heterogeneity. Numerous clinical data support this concept^{20–23}. Molecular data supporting biological heterogeneity in human peripheral arteries are scarce, however. Seo *et al.* compared gene expression in proximal and distal aorta from heart donors²⁴. They identified a small group of genes with location-dependent expression levels. More recently, Sulkava *et al.* identified genes differentially expressed between atherosclerotic plaques from CA and FA and from abdominal aortas in humans, reflecting plaque heterogeneity between these beds²⁵.

The aim of our study was to better understand differential plaque calcification among different peripheral arterial beds. We first analyzed the association between CVRF exposition and atherosclerosis plaque calcification using our human plaque bio-collections ECLA and ECLAGEN. As classic CVRF did not show a major impact on plaque calcifications in CA, FA or infrapopliteal arteries (IPA), we analyzed arterial-bed-specific gene expression profiles in both atherosclerotic and healthy arteries by transcriptomic analysis with a particular focus on calcification-associated genes.

Materials and Methods

Patients. From February 2008 to December 2015, atheromatous plaques were harvested and collected (ECLA and ECLAGEN bio-collections) from patients undergoing carotid, femoral or infrapopliteal endarterectomy in the Department of Vascular Surgery at Nantes University Hospital. Details about this bio-collection have been published elsewhere^{26,27}. Healthy arteries free of atherosclerotic lesions were obtained from organ donors. Sample collection and handling was performed in accordance with the guidelines of the Medical and Ethical Committee in Nantes, France, and written informed consent was obtained from all patients and from next of kin for all organ donors. The experimental protocol was approved by the Agence de Biomédecine (research protocol #PFS09–014, authorized on Dec 23, 2009, by the Agence de Biomédecine, France). Legal and ethical authorizations were granted by the French Research Ministry (n° DC-2008–402), the National Commission for Computerized Information and Liberties (CNIL, n° 1520735v 0), and the local ethical committee (GNEDS). Patients suffering from non-atherosclerotic peripheral arterial disease, thrombosis or restenosis were excluded. Demographic and clinical data were collected, including age, gender, treatment, CVRF (high blood pressure, diabetes mellitus, dyslipidemia, tobacco use (active/past user) and obesity (BMI ≥ 30 kg/m²)), and Cockcroft creatinine clearance. Prior to surgery, blood specimens were collected for lipid balance and phospho-calcic metabolism assessments.

CVRF were defined as follows. Regarding smoking, we unfortunately do not know whether smoking was still active at the sampling time. We only looked at tobacco exposure. The definition of diabetes was the presence of two fasting blood glucose measurements >1.26 g/l. Hypertension was defined as the presence of persistent blood pressure (>140 mmHg diastolic, 90 mmHg systolic) for more than three months. Dyslipidemia was present when LDL levels were higher than defined thresholds, which depended on the presence of a cardiovascular event, diabetes, and the number of associated CVRE.

For CA and FA, endarterectomies were performed on a consecutive series of patients using conventional surgical techniques according to ESVS guidelines²⁸. For these arteries, the sample was limited to one lesion because endarterectomies were performed. The plaque was removed at the bifurcation from the lumen as a single specimen. For IPA, the sample with the most severe atheromatous lesion was harvested. All samples were 1–2 cm long. For histology, we analyzed sections of the core of the lesion present in each arterial sample.

CA samples were mostly collected in endarterectomy procedures (97.4% of cases), and arterial bypass was performed in 2.6% of cases. For FA, 68.4% of the arteries were removed during bypass surgery, 30.5% after endarterectomy and 1.1% after amputation. Approximately 11.6% of the FA were thrombosed before the surgical procedure. For IPA, 88% were removed after amputation and 12% after bypass surgery. Approximately 24% of IPA were thrombosed before the surgical procedure.

The exclusion criteria for non-atheromatous arteries and patients were a history of cardiovascular diseases (ischemia cardiopathy, stroke, or peripheral artery diseases) or the presence of macroscopic athero-thrombosis during tissue collection.

Histology processing. The atherosclerotic plaques were harvested and fixed in 10% formalin for 24–48 h and then decalcified in Sakura TDE 30 fluid. They were embedded in paraffin. Sections (4- μ m thickness) were stained with hematoxylin eosin (HE). Whole sections were imaged with a NanoZoomer digital slide scanner (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan).

Histological classification of atherosclerotic plaque calcification. The sections were graded according to a previously described strategy^{3,4}. Atherosclerotic plaque calcification classification was based on five categories: no calcification, microcalcifications, sheet calcifications, nodular calcifications, and osteoid metaplasia³. Microcalcifications consisted of <50 - μ m vesicle-like structures outlined by calcium deposits; sheet calcifications were defined as a large calcifying fibrosis; nodular calcification was characterized by dense circular calcified structures; osteoid metaplasia consisted of bone tissue with typical stratified osteoid matrix encapsulating osteocyte-like cells surrounding lipid-rich bone marrow.

For each artery, three sections of pathological or healthy segments were analyzed. Sections were classified in a blinded fashion by two independent investigators (TQ and OE).

	Tobacco n, (%)	Hypertension n, (%)	Diabetes mellitus n, (%)	Dyslipidemia n, (%)	Mean age ($\pm$ SD)	Sex (male) n, (%)	Obesity n, (%)	eGFR < 60 ml/min n, (%)
CA	59 (38.6)	123 (80.4)	35 (22.9)	120 (78.9)	70 $\pm$ 10	112 (73.2)	22 (14.4)	43 (28.1)
FA	50 (51.5)	74 (76.3)	33 (34.0)	66 (68.0)	67 $\pm$ 9	85 (87.6)	16 (16.5)	17 (17.5)
IPA	2 (7.1)	23 (82.1)	18 (64.3)	12 (42.9)	74 $\pm$ 12	21 (75.0)	7 (25.0)	13 (46.4)
Global p	<0.001	0.73	<0.001	0.001	0.003	0.02	0.34	0.008
FA vs CA	0.05	—	0.06	0.07	0.001	0.007	—	0.07
FA vs IPA	<0.001	—	0.008	0.03	0.001	0.13	—	0.005
CA vs IPA	0.001	—	<0.001	<0.001	0.06	0.52	—	0.07

Table 1. Frequency of cardiovascular risk factors among arterial beds. (CA: carotid arteries, FA: femoral arteries, IPA: infrapopliteal arteries, eGFR: estimated glomerular filtration rate).

Gene expression analysis. Samples for RNA processing were harvested and immediately snap-frozen in liquid nitrogen or stored in All-protect Tissue Reagent (Qiagen). Total RNA was extracted from 31 healthy arteries (10 CA, 11 FA, and 10 IPA) and 65 atherosclerotic arteries (27 CA, 25 FA, 13 IPA) using Macherey Nagel NucleoSpin columns (Macherey Nagel, Düren, Germany). RNA was hybridized to Agilent Human Gene Expression Microarrays. Fluorescence values corresponding to raw expression data were extracted using Feature Extraction Software (Agilent). Positive and negative control probes were removed. Non-linear effects, such as background or saturation, were corrected by Lowess against a median profile of all samples. Values of replicate probes were averaged, and the data matrix was filtered to 20,000 probes based on highest median expression values. Microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO Series accession number GSE100927. Clusters of co-expressed genes were identified using the partitioning clustering method k-means ($k = 10$)²⁹ on natural-log-transformed and gene-median-centered data with uncentered correlation as a similarity metric in Gene Cluster 3.0³⁰. Hierarchical clustering was performed using Gene Cluster 3.0, and heatmaps were displayed using Java Treeview³¹. Clusters separating the different arterial beds were selected, and a collective p was calculated. For each sample, a mean expression value of all genes from the cluster was calculated. The hereby obtained mean values of different arterial beds were compared. This strategy, which was based on strong correlations of gene expression, allowed us to avoid multitesting.

Two-class significance analysis of microarrays (SAM)³² was used to identify genes with statistically significant differential expression between different arterial territories. With this method, each gene is first assigned a score on the basis of a modified t-test, and genes with scores greater than a user-defined threshold are selected. Repeated random sample permutations are used to estimate the percentage of genes identified by chance (false discovery rate, FDR) among the selected genes. The FDR is similar to a p adjusted for multiple comparisons. For all SAM analyses, the chosen delta threshold corresponded to the lowest median FDR (FDR = 0%).

Gene Ontology (GO)³³ enrichment analysis of the different clusters was performed using GoMiner³⁴. Enrichment of GO terms was determined using the 20,000 probe list as background. Annotations with FDR < 0.05 were considered significant. GO terms enriched in gene lists obtained after SAM analysis were filtered to remove redundancy, and the top scoring elements were visualized using the web-based tool REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>)³⁵. For atherosclerotic arteries, only GO terms with FDR = 0% were used as input in REVIGO. For healthy arteries, GO terms with FDR < 0.05 were used. The parameters were as follows: Allowed similarity = Small (0.5); Homo sapiens database; and Simrel as semantic similarity measure.

Statistical analysis. Continuous data are presented as the mean ($\pm$ standard deviation). Categorical variables are presented as counts (proportions). T-tests were performed to test for significant differences in continuous parameters between two or more groups. The χ^2 or Fisher exact test (based on expected frequency) was used to compare categorical variables between groups. The Bonferroni method was used for post hoc tests. We adjusted the p level according to the number of hypotheses tested. Logistic regression analysis [with odds ratios (OR) and confidence intervals (CI)] was used to evaluate the association between CVRF and calcification. From univariate analysis, we selected variables with $p < 0.10$ (statistical criterion). Variables were eliminated from highest to lowest p in the multivariate model, but remained in the final model if p was less than 0.05 or seemed to be confounding (more than 10% change in estimate). All two-way interactions between pairs of predictors in the model were tested one at a time. $p < 0.05$ was considered statistically significant when no Bonferroni correction was applied. Data were analyzed with SAS packages (SAS Institute Inc. version 9.4, Cary, NC).

CVRF and calcifications were analyzed by comparing the arterial territories (CA, FA and IPA) in pathological arteries.

Data availability statement. The datasets generated and/or analyzed in the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Results

Cardiovascular risk factors, arterial territories and atherosclerotic plaque calcification heterogeneity. Two hundred seventy-eight atherosclerotic arteries were evaluated (153 CA, 97 FA and 28 IPA). We first assessed the impact of CVRF on atherosclerotic disease in different arterial territories (Table 1). Tobacco use was significantly associated with atherosclerotic FA; diabetes mellitus was more frequent in patients with diseased IPA. Dyslipidemia was more frequent in carotid disease, and patients with infrapopliteal disease were significantly

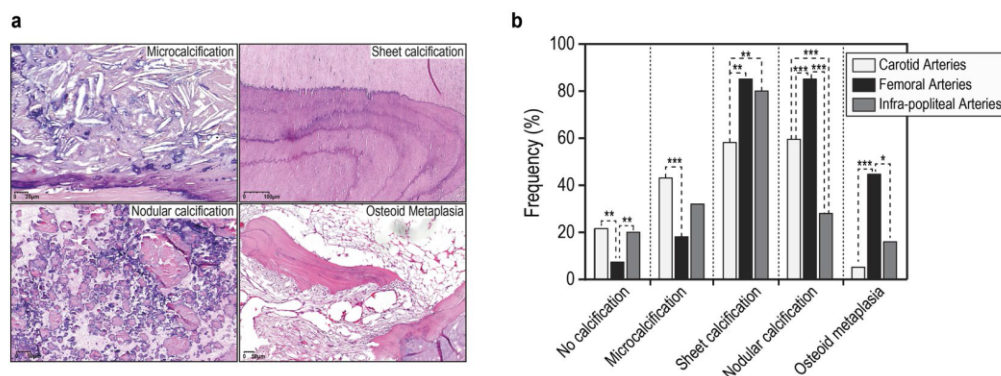


Figure 1. (a) Hematoxylin eosin (HE) staining showing microcalcification, sheet calcification, nodular calcification, and osteoid metaplasia. (b) Atherosclerotic plaque calcification distribution among arterial territories (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$).

older and had a lower estimated glomerular filtration rate (eGFR) under 60 ml/min than patients with disease in other territories.

Before surgery, patients were treated with statins in 68.6% of CA, 66.3% of FA and 68% of IPA cases. Patients were treated with ACE inhibitor therapy in 61.6% of CA, 31.6% of FA, and 20% of IPA cases. Angiotensin 2 receptor blockers were given to 22.6%, 15.8% and 8% of patients with CA, FA, and IPA, respectively. Patients received another antihypertensive treatment, respectively, in 45.8%, 45.3% and 64% of CA, FA, and IPA cases. Diabetes was treated in 22.9% of patients with CA, 34% of patients with FA and 64% of patients with type 2 diabetes had metformin in 5.9%, 14.7% and 24% of CA, FA, and IPA cases respectively.

The non-atherosclerotic group consisted of 62 patients (20 CA, 20 FA and 22 IPA), the mean age was 49.3 years, 47.3 years and 47.2 years for CA, FA, and IPA, respectively; 72.2% were men (65%, 75% and 77.3%, respectively, in CA, FA, and IPA), 33.9% had current smoking (35%, 35% and 31.8% in CA, FA, and IPA, respectively); 24.2% had hypertension (30%, 20% and 22.7% in CA, FA, and IPA, respectively), 1.6% had diabetes (5% of CA); 9.7% had dyslipidemia (15%, 10% and 4.5% in CA, FA, and IPA, respectively), and 27.4% were obese (35%, 25% and 22.7% in CA, FA, and IPA, respectively). Approximately 6.5% of non-atherosclerotic group had estimated glomerular filtration under 60 ml/min (10% of CA, 5% of FA and none in IPA).

All diseased arteries presented with advanced atherosclerotic plaques and differentially encompassed the main calcification types illustrated in Fig. 1a,b shows the distribution of calcification types according to arterial territory.

Overall, FA were extensively calcified and presented more plaque calcification than CA ($p = 0.02$).

Osteoid metaplasia was more frequent in FA than in CA ($p < 0.0001$) or IPA ($p < 0.05$). In contrast, CA developed more microcalcifications than FA ($p = 0.001$). Sheet and nodular calcifications also varied among arterial beds: FA presented with more sheet ($p < 0.0001$) and more nodular calcification ($p < 0.0001$) than CA. Forty-four samples showed no calcification at all. In most cases, several types of calcification were present within the same atherosclerotic plaque. On average, 1.6 types of calcifications were found in CA; 2.6 in FA and 1.5 in IPA.

Multivariate analysis comparing calcified vs non-calcified plaques showed that age ($p = 0.003$), hypertension ($p = 0.02$) and territory ($p = 0.007$) were significantly associated with the presence of calcification in atherosclerotic plaques. However, no significant association was identified between CRVF and type of calcification (osteoid metaplasia, microcalcification, sheet calcification or nodular calcification) (Table 2).

Multivariate analysis further confirmed that arterial bed influences the presence of osteoid metaplasia, as FA developed drastically more osteoid metaplasia than CA or IPA ($p < 0.0001$) (Fig. 2). Sheet and nodular calcifications also varied among arterial beds; FA presented more sheet ($p < 0.0001$) and more nodular calcification ($p < 0.0001$) than CA.

K-means clustering of arterial territories. CVRF affect plaque development differently between arterial beds, but they have minor effects on differential calcification in atherosclerosis lesions. We explored the hypothesis that calcification heterogeneity might be directly derived from intrinsic vascular bed heterogeneity by performing transcriptome analysis on atherosclerotic and healthy arteries from the CA, FA, and IPA territories. We first obtained an overview of the functional annotations associated with each arterial territory by using k-means clustering combined with Gene Ontology enrichment analysis. Atherosclerotic lesions display clear arterial-territory-associated gene expression profiles (Fig. 3a). Of the ten clusters, all but one cluster (cluster 6) display differential expression between at least two arterial territories. In addition, all clusters were significantly enriched in functional annotations. Clusters 7 to 10 show the most extreme expression differences, clearly distinguishing CA vs. FA and IPA. Genes highly expressed in CA (clusters 9 and 10) were significantly enriched in functional annotations related to immune response, lipid storage, lysosomal functioning, bone resorption, hemostasis, extracellular matrix and apoptosis. Genes highly expressed in FA and IPA (clusters 7 and 8) were significantly enriched in functional annotations related to extracellular matrix, angiogenesis, osteoblast differentiation, regionalization, muscle contraction, endochondral bone morphogenesis, cell adhesion, synapse and transcription. Although the expression profiles of atherosclerotic FA and IPA were similar, some functions appear

	Microcalcifications n = 91	Sheet n = 189	Nodules n = 178	OM n = 54	No calcification n = 44
Tobacco n, (%)	41 (44.6)	78 (84.8)	74 (80.4)	25 (27.2)	17 (15.6)
Hypertension n, (%)	79 (41.6)	160 (84.2)	145 (76.3)	42 (22.1)	26 (13.2)
Diabetes mellitus n, (%)	28 (39.4)	64 (90.1)	55 (77.5)	20 (28.2)	10 (14.7)
Dyslipidemia n, (%)	67 (40.6)	140 (84.8)	132 (80.0)	40 (24.2)	31 (16.7)
Mean age ($\pm$ SD)	71 $\pm$ 10	70 $\pm$ 11	72 $\pm$ 12	71 $\pm$ 10	66 $\pm$ 10
Sex (male) n, (%)	69 (36.9)	160 (85.6)	146 (78.1)	43 (23.0)	28 (14.2)
Obesity n, (%)	20 (54.1)	33 (89.2)	29 (78.4)	7 (18.9)	6 (15.8)
eGFR < 60 ml/min n, (%)	25 (39.1)	54 (84.4)	44 (68.8)	15 (23.4)	7 (11.7)

Table 2. Frequency of cardiovascular risk factors in calcification subtypes. No significant link was found between risk factors and calcification subtypes. (OM: osteoid metaplasia; SD: standard deviation; eGFR: estimated glomerular filtration rate).

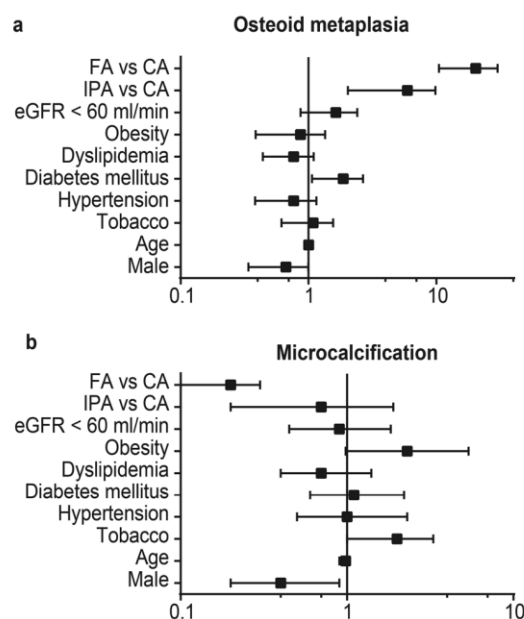


Figure 2. Forrest plot of relationships between cardiovascular risk factors, arterial territories and osteoid metaplasia (a) or microcalcification (b). Arterial territories influence the type of plaque calcification, whereas cardiovascular risk factors are not associated with the type of calcification. (CA: carotid arteries, FA: femoral arteries, IPA: infrapopliteal arteries, eGFR: estimated glomerular filtration rate)

to be differently affected in both arterial territories. Genes involved in hematopoiesis, apoptosis, transcription, angiogenesis and inflammatory response (cluster 1) were more highly expressed in FA than in IPA. The opposite was observed for genes involved in protein lipidation, zinc ion binding and transcription (cluster 4). In healthy arteries without atherosclerotic lesions, we also identified associations between arterial territories and functional annotations, albeit to a lesser extent (Fig. 3b). As in the pathological arteries, genes associated with immune response, cholesterol storage, apoptosis, lysosome and bone resorption (cluster 4) were more highly expressed in CA than in FA and IPA, whereas genes involved in muscle contraction and regionalization had lower expression in CA than in FA and IPA (cluster 9). Differences between the pathological and healthy tissues were also observed. In healthy arteries, functional annotations associated with the genes from cluster 10 (including osteoblast proliferation and pattern specification process) were affected by up-regulation in CA compared to FA and IPA. This result was not found in pathological arteries.

Differential gene expression analysis of arterial territories. Two-class SAM analysis (FDR = 0) between the different arterial territories identified a large number of differentially expressed genes in atherosclerotic arteries. The number of differential genes seemed to be proportional to the anatomical distance between the arterial territories: 5,181 genes between CA and IPA, 3,836 genes between CA and FA and 257 genes between FA and IPA. As shown schematically in Fig. 4 (left side), genes that were differentially expressed between CA and FA largely overlapped those that were differentially expressed between CA and IPA. In healthy arteries, we also identified genes that were differentially expressed between the three arterial territories (Fig. 4, right side). Again,

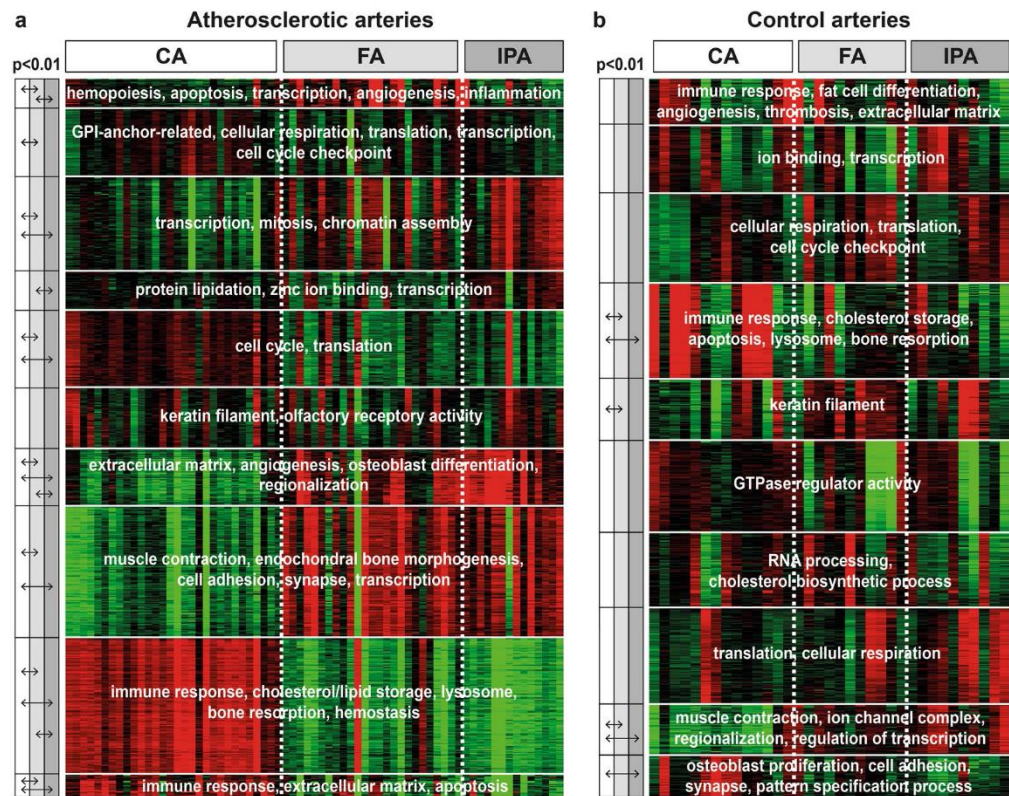


Figure 3. K-means clustering and GO enrichment analysis of (a) atherosclerotic and (b) healthy arteries. Gene expression is presented as a colored matrix in which each row represents a gene and each column represents a sample. Green, black and red correspond to lower values, median values and higher values, respectively. Representative enriched Gene Ontology terms (FDR < 5%) are indicated within each cluster. Within each cluster, the average of all probes was calculated for each sample. These average values were then compared between the arterial territories with Student's t-test. Inter-territorial comparisons with $p < 0.01$ are indicated by horizontal arrows on the left side of the clusters. White = CA = carotid artery; light gray = FA = femoral artery; dark gray = IPA = infrapopliteal artery.

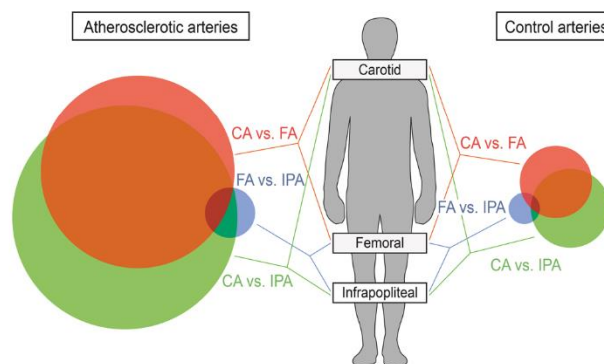


Figure 4. Proportional Venn diagram of differentially expressed genes between 3 arterial territories in atherosclerotic and healthy arteries according to two-class SAM analysis⁵⁰.

the number of differential genes seemed proportional to the anatomical distance: 215 genes between CA and IPA, 201 genes between CA and FA and 8 genes between FA and IPA. For atherosclerotic arteries, anatomical distance was reflected by a substantial overlap between genes that were differentially expressed between CA and IPA and between CA and FA. However, this overlap was relatively smaller in healthy arteries than in atherosclerotic arteries, pointing towards a more territorial-specific gene expression profile in healthy arteries. All genes are listed in Supplementary File 1.

Carotid vs Femoral					
Atherosclerotic arteries			Healthy arteries		
Gene symbol	Gene name	FC	Gene symbol	Gene name	FC
Up-regulated					
MMP7	Matrix Metalloproteinase 7	6.0	CCL18	C-C Motif Chemokine Ligand 18	10.4
APOC1	Apolipoprotein C1	5.1	HAND2	Heart and Neural Crest Derivatives Expressed 2	4.6
MMP12	Matrix Metalloproteinase 12	4.7	KCNK17	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 17	4.4
HS3ST2	Heparan Sulfate-Glucosamine 3-Sulfotransferase 2	3.7	HAND2-AS1	HAND2 Antisense RNA 1	4.1
HTRA4	htrA Serine Peptidase 4	3.6	SPINT2	Serine Peptidase Inhibitor, Kunitz Type 2	3.6
PKD2L1	Polycystin 2 Like 1, Transient Receptor Potential Cation Channel	3.5	MTUS2	Microtubule Associated Tumor Suppressor Candidate 2	3.2
CHIT1	Chitinase 1	3.4	RBP4	Retinol Binding Protein 4	3.0
MMP1	Matrix Metalloproteinase 1	3.3	CCDC146	Coiled-Coil Domain Containing 146	3.0
CHI3L1	Chitinase 3 Like 1	3.3	HS3ST2	Heparan Sulfate-Glucosamine 3-Sulfotransferase 2	2.9
IL4I1	Interleukin 4 Induced 1	3.2	CLEC4GP1	C-Type Lectin Domain Family 4 Member G Pseudogene 1	2.9
Down-regulated					
HOXC6	Homeobox C6	-9.9	HOXC9	Homeobox C9	-11.4
HOXC9	Homeobox C9	-9.3	HOXC6	Homeobox C6	-9.3
HOXC4	Homeobox C4	-6.2	HOTAIR	HOX Transcript Antisense RNA	-6.7
HOXA7	Homeobox A7	-6.1	HOXA7	Homeobox A7	-5.9
DES	Desmin	-5.5	EMX2OS	EMX2 Opposite Strand/Antisense RNA	-5.7
HOTAIR	HOX Transcript Antisense RNA	-5.4	HOXC4	Homeobox C4	-5.3
PITX1	Paired Like Homeodomain 1	-4.4	EMX2	Empty Spiracles Homeobox 2	-5.2
HOXA9	Homeobox A9	-4.3	HOXA9	Homeobox A9	-5.2
HOXC8	Homeobox C8	-4.2	SLN	Sarcolipin	-5.2
CXCL14	C-X-C Motif Chemokine Ligand 14	-4.1	DES	Desmin	-5.2
Carotid vs Infrapopliteal					
Atherosclerotic arteries			Healthy arteries		
Gene symbol	Gene name	FC	Gene symbol	Gene name	FC
Up-regulated					
MMP7	Matrix Metalloproteinase 7	14.2	RBP4	Retinol Binding Protein 4	4.1
MMP12	Matrix Metalloproteinase 12	12.6	MTUS2	Microtubule Associated Tumor Suppressor Candidate 2	4.1
APOC1	Apolipoprotein C1	9.3	KCNK17	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 17	3.5
CCL18	C-C Motif Chemokine Ligand 18	8.7	SPINT2	Serine Peptidase Inhibitor, Kunitz Type 2	3.4
SPP1	Secreted Phosphoprotein 1	7.4	PLIN4	Perilipin 4	3.0
MARCO	Macrophage Receptor with Collagenous Structure	6.8	PIANP	PILR Alpha Associated Neural Protein	2.9
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9	6.1	FAM19A5	Family with Sequence Similarity 19 Member A5, C-C Motif Chemokine Like	2.7
HS3ST2	Heparan Sulfate-Glucosamine 3-Sulfotransferase 2	6.0	MS4A4A	Membrane Spanning 4-Domains A4A	2.7
CHIT1	Chitinase 1	5.7	COL4A4	Collagen Type IV Alpha 4 Chain	2.7
IL1RN	Interleukin 1 Receptor Antagonist	5.6	CECR1	Cat Eye Syndrome Chromosome Region, Candidate 1	2.7
Down-regulated					
HOXC6	Homeobox C6	-9.9	HOXC9	Homeobox C9	-8.5
HOXC9	Homeobox C9	-9.3	HOXC6	Homeobox C6	-7.6
HOXC4	Homeobox C4	-6.2	HOXA9	Homeobox A9	-7.1
HOXA7	Homeobox A7	-6.1	EMX2OS	EMX2 Opposite Strand/Antisense RNA	-6.4
DES	Desmin	-5.5	HOXA7	Homeobox A7	-6.3
HOTAIR	HOX Transcript Antisense RNA	-5.4	EMX2	Empty Spiracles Homeobox 2	-6.0
PITX1	Paired Like Homeodomain 1	-4.4	HOTAIR	HOX Transcript Antisense RNA	-6.0
HOXA9	Homeobox A9	-4.3	HOXC4	Homeobox C4	-5.2

Figure 5. Top 10 most differentially expressed genes between arterial territories in atherosclerotic and healthy arteries after SAM analysis (FDR = 0%). (IPA: infrapopliteal arteries, FC: fold changes, FDR: false discovery rate).

Figure 5 shows the top 10 most differentially expressed genes between the three arterial territories in both atherosclerotic and healthy arteries. For atherosclerotic arteries, the results were very similar for the comparisons between CA and FA and between CA and IPA: compared to both FA and IPA, CA displayed higher expression levels of several matrix metalloproteinases (MMP7, MMP12, MMP1 (CA vs. FA only) and MMP9 (CA vs. IPA only)) and lower expression levels of several homeobox genes (HOXA7, HOXA9, HOXC4, HOXC6, HOXC8 and HOXC9). The FA vs. IPA comparison revealed higher expression levels of AP-1 transcription factor complex components (FOSB, FOS and ATF3) in FA and lower expression levels of two bone-related genes (STMN2 and CHI3L2) and two angiogenesis-related genes (ISM1 and SFRP1). Among the top 10 most differentially expressed genes in healthy tissue, four genes were expressed at a higher level in CA than in both FA and IPA: KCNK17,

SPINT2, MUTS2 and RBP4. CCL18, which is involved in inflammatory and immune responses, was the most differential gene in CA vs. FA. Perilipin 4 (PLIN4), which is involved in the biogenesis of lipid droplets, was among the genes that were expressed at a higher level in CA vs. IPA. As in atherosclerotic arteries, several homeobox genes (HOXA7, HOXA9, HOXC4, HOXC6, HOXC9, and EMX2) were expressed at a lower level in CA vs. both FA and IPA in healthy arteries. Gene expression differences between healthy FA and IPA resembled those between atherosclerotic FA and IPA with the involvement of AP-1 transcription factor complex components (more highly expressed in FA) and vascular-development-associated gene HAND2 (more highly expressed in IPA).

Figure 6 displays an overview of functional annotations enriched among differentially expressed genes between CA and FA. Because of the limited number of genes differentially expressed between FA and IPA, we did not include IPA in this analysis. In atherosclerotic tissue, genes that were more highly expressed in CA than in FA are characterized by their association with inflammatory processes, including innate and adaptive immunity, such as interleukin-1 production and antigen presentation. Genes that were more highly expressed in FA than in CA show a clear enrichment of bone-development-associated functional categories. In healthy tissue, the smaller number of genes differentially expressed between CA and FA somewhat limited the analysis. However, we were able to reveal an association between a higher expression in CA vs. FA and functional categories associated with the immune system. Genes that were more highly expressed in FA than in CA healthy tissue were mostly involved in muscle and skeletal system development. The full list of enriched GO terms is provided in Supplementary File 2.

Calcification transcriptional signature of arterial territories. To further focus on the association between arterial territories and differential calcification, we selected genes involved in calcification-related functions from those differentially expressed among the three arterial territories in control samples based on multiclass SAM analysis. A total of 39 genes were selected based on the presence of the terms ‘bone’, ‘cartilage’, ‘mineralization’ or ‘skeletal development’ in their GO categories or on literature analysis. Figure 7 shows that two-way hierarchical clustering based on these 39 calcification-related genes separated the control arteries into three groups: One group – very distinct from the other two groups – consisting only of carotid arteries, one group consisting mainly of femoral arteries, and one group consisting mainly of infra-popliteal arteries. Two main gene expression profiles – separated by a solid white horizontal line in Fig. 7 – are responsible for this separation: A group of 11 genes with a significant higher expression level in CA than in FA and IPA, and a group of 28 genes with an inverse profile. Among these 39 genes, six (denoted with an asterisk in Fig. 7) have been associated with negative effects on bone formation and they all display a higher gene expression level in CA than in FA and IPA. HAND2 shows the most consistent lowest expression level in all FA samples. Dotted horizontal lines in Fig. 7 delineate gene clusters with differential expression between each arterial bed.

Discussion

This study further demonstrates calcification plaque heterogeneity among peripheral arteries. Osteoid metaplasia is very frequent in FA, whereas microcalcifications are more prominent in CA. Our results show that plaque calcification types are not linked to CVRF, whereas CVRF specifically associate with peripheral territory in atherosclerosis. This finding is supported by previous studies showing that tobacco induces more lesions in arteries of the lower limbs than in cerebral or coronary arteries and that hypertension favors intracranial atheroma^{9–11}. Older age, male sex, diabetes, heart failure, and critical limb ischemia are associated with distal disease, whereas female sex, smoking, hypertension, dyslipidemia, coronary heart disease, cerebrovascular disease, chronic obstructive pulmonary disease, and critical limb ischemia are associated with proximal disease. In patients with PAD, proximal and distal disease locations are associated with distinct risk factors and comorbidity profiles. Distal disease is associated with worse survival even after adjustment for risk factors, comorbidities, and resting ankle brachial index⁹. Accordingly, we report in our study that tobacco use was more frequent among patients undergoing femoral endarterectomy than among those who underwent carotid endarterectomy and that dyslipidemia was more frequent among the latter group.

Plaque calcification and morphology have also been reported to be linked to chronic kidney disease, insulin resistance and dyslipidemia in patients with PAD³⁶. However, even though CVRF have an impact on the location of disease progression, they do not appear to have a significant impact on the type of calcification according to our findings; age and hypertension are the only CVRF associated with vascular calcification. Age potentially reflects the progression of disease, and hypertension may reflect the extent of calcification rather than act as a causal factor.

Altogether, these results further reveal a high degree of heterogeneity among arterial beds, as they are differentially associated with CVRF in atherosclerosis development, developing distinct plaques and calcification types^{3,37,38}. Arterial biological heterogeneity, which may be directly responsible for these discrepancies, has also been repeatedly observed clinically. Long term outcomes after open surgery show drastic differences depending on the area treated. The infra renal aorta and its branches (including FA) has greater atherosclerosis recurrence than the aortic arch or the celiac aorta²⁰. Stenting results also suggest arterial heterogeneity depending on the treatment area. Clinical studies have shown that rates of intra-stent restenosis vary considerably from one arterial location to another: the frequency of restenosis at one year is between 6 and 9% at the carotid level, 20% at the common femoral level and between 30 and 40% at the superficial femoral level^{21,39–43}. For arteries of smaller caliber, such as leg arteries, the intra-stent restenosis rates (30–50%) exceed those observed in the coronary artery (10–35%)^{22,44}. Moreover, restenosis progression differs between arterial beds. The risk of restenosis in coronary arteries has been shown to reach a plateau at six months⁴⁵. For FA, the plateau occurs between 12 and 18 months²¹.

Arterial heterogeneity has thus been known for years, but little data are available at molecular level as evidence to support this notion. We are the first to identify transcriptomic differences according to peripheral arterial beds

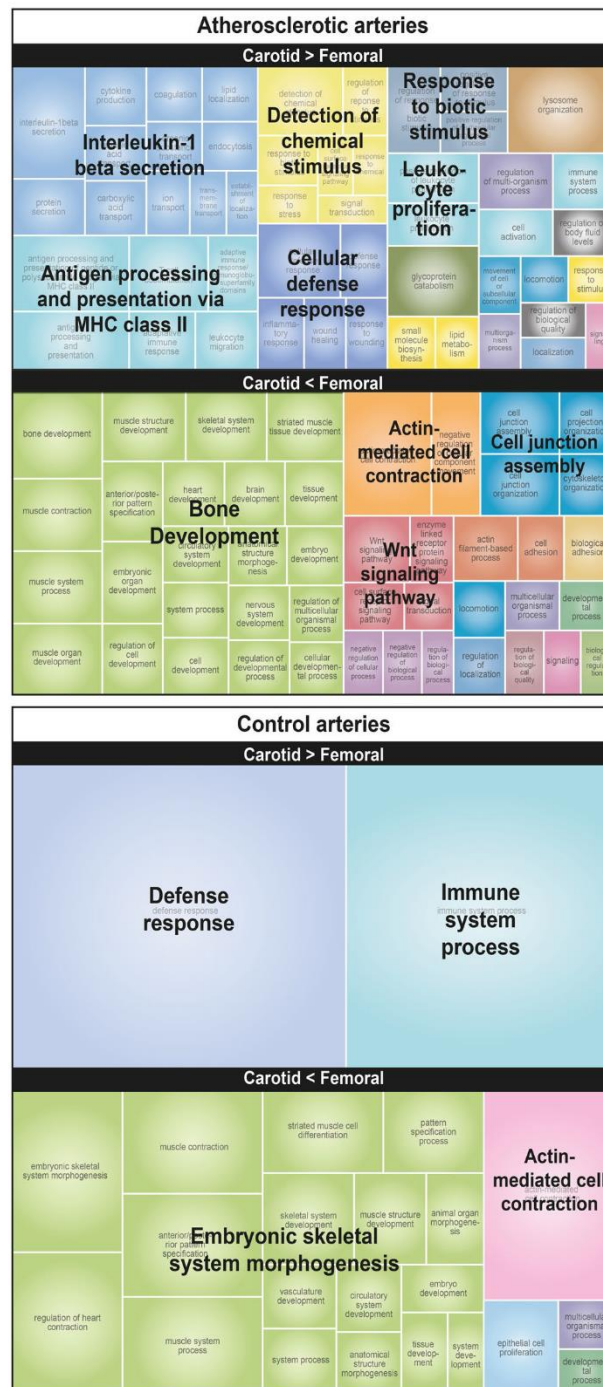


Figure 6. REVIGO TreeMap view of GO terms enriched among up- (upper TreeMaps) or down-regulated (lower TreeMaps) genes in CA vs. FA in atherosclerotic and healthy tissue. Input consisted of GO terms enriched at FDR = 0% for atherosclerotic arteries or FDR < 5% for healthy arteries with at least 5 changed genes per GO category. Each rectangle is a single cluster representative. The representatives are joined into 'superclusters' of loosely related terms that are visualized with distinct colors (indicated by centralized black text). The size of the rectangles reflects the enrichment of the GO term.

for both atherosclerotic and healthy human arteries. Sulkava *et al.* analyzed the differential expression of major pathways by comparing different pathological territories (CA, FA and abdominal aorta) to healthy internal thoracic arteries²⁵. Arterial territory-associated gene expression changes were studied in only atherosclerotic arteries. In agreement with their results, we identified several HOX genes that were expressed at a significant lower level

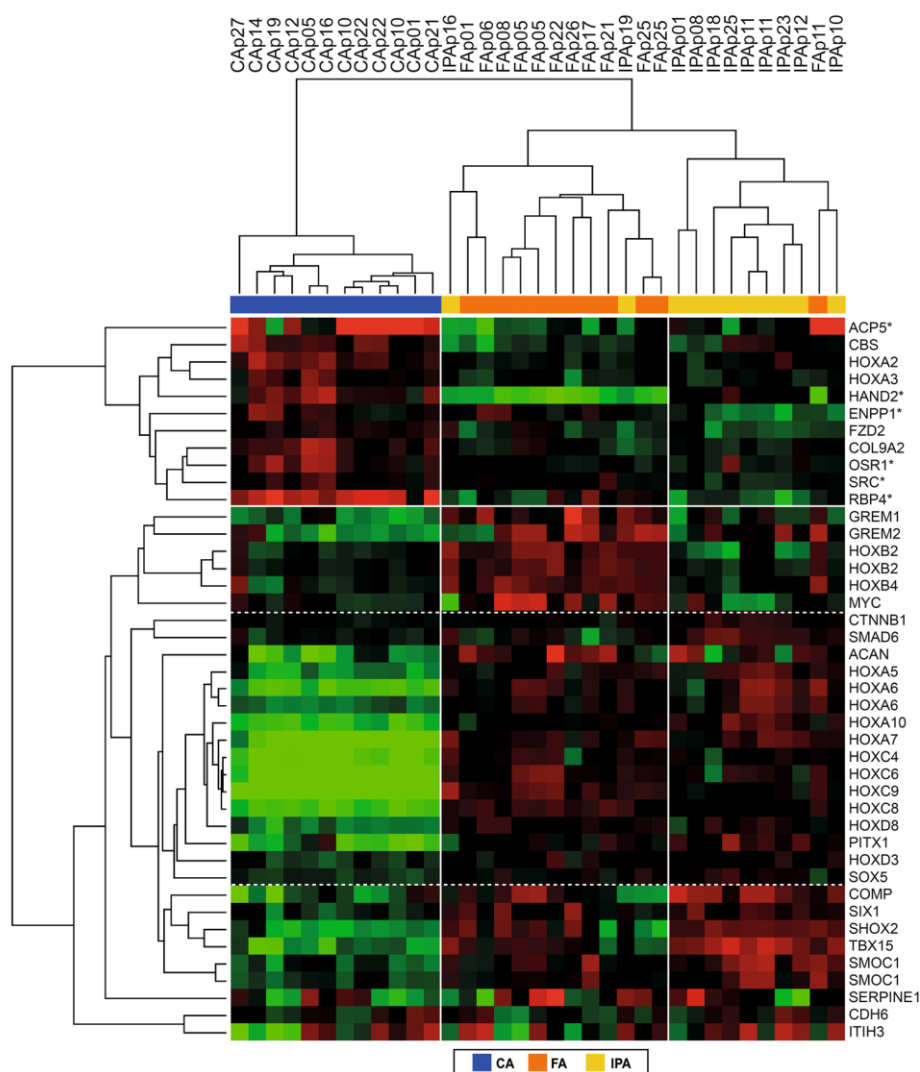


Figure 7. Two-way hierarchical clustering of control arteries and calcification-related genes. Genes were selected based on significant differential expression between the three arterial beds in control arteries (multiclass SAM analysis, FDR = 0%) and an association with bone-related functions through literature analysis or the presence of the terms ‘bone’, ‘cartilage’, ‘mineralization’ or ‘skeletal development’ in their GO categories. Gene expression is presented as a coloured matrix where each row represents a gene and each column a sample. Green, black and red correspond to lower values, median values and higher values, respectively. Colour coding of the samples is as follows: blue = carotid arteries, orange = femoral arteries, yellow = infra-popliteal arteries. The main branches of the gene and sample clusters are separated by white lines.

in atherosclerotic CA vs. FA. Some overlap (including HOXA2) was also identified between both gene lists with significantly higher expression levels in atherosclerotic CA vs. FA. However, in contrast to their findings, we identified higher expression of several MMPs in CA vs. FA. The comparison between both studies was limited by the fact that Sulkava *et al.* only included genes in this analysis that were differentially expressed in pathological vs. healthy arteries. Furthermore, they did not directly compare the implication of canonical pathways in atherosclerosis in different arterial beds; instead, they only listed pathways that they found to be involved in pathological vs. healthy arteries. Therefore, their study provided ample results on genes involved in atherosclerosis in general, but did not provide results on inter-territorial differences. Our study focused on the differences between carotid, femoral and infrapopliteal arterial beds in both atherosclerotic and healthy tissue. Gene Ontology enrichment analysis of k-means clusters clearly reflected the known histological characteristics of carotid vs. femoral atherosclerotic plaques³. The association of femoral plaques with the presence of bone-related features was illustrated by an enrichment of genes involved in osteoblast differentiation and bone morphogenesis in these plaques. Examples include the high expression levels of transforming growth factor beta 3 (TGFβ3) and bone morphogenetic protein 2 (BMP), which have a synergistic effect of osteogenic differentiation⁴⁶. BMP2 kinase (BMP2K), which may impair osteoblast differentiation, had reduced expression in femoral plaques⁴⁷. Two structurally related members

from the thrombospondin family (COMP and THBS3) were also among the femoral-plaque-specific genes. Both of these extracellular matrix genes are involved in bone development, and COMP has been shown to be stimulated by TGFβ⁴⁸. The enrichment of immune response and lipid-related functional categories in carotid atherosclerotic arteries corresponded with the known enrichment of lipids and inflammatory cells in these plaques. In our analysis focused on the identification of genes that were significantly differentially expressed between diseased arterial beds, we consistently found key players in inflammation, matrix remodeling (MMPs), and numerous HOX family genes. HOX genes encode transcription factors that play a key role in morphogenesis. Genes regulated by HOX transcription factors are involved in development and skeletal differentiation.

These results most likely reflect the major differences in composition observed histologically between lipid-rich and inflamed lesions in CA compared to fibrotic and heavily calcified plaques in FA^{25,49}. Our study identified gene expression changes between non-atherosclerotic arterial tissue from different arterial territories. These results now allow us to distinguish between genes involved in atherosclerosis at the clinical stage of the disease (e.g., metalloproteinases) and genes potentially involved in differential predisposition to the disease (HOX genes and the AP-1 transcription factor complex). The differential representation of functional categories among genes expressed in different arterial beds in healthy arteries displayed striking similarities to those in atherosclerotic arteries. In both cases, genes involved in the immune system are more strongly expressed in CA than in FA, whereas genes involved in skeletal (bone) development and muscle function are more strongly expressed in FA than in CA. These results are consistent with the type of lesions typically found in these locations. This important finding suggests that arterial heterogeneity precludes the evolution of plaque fate and may be critical in predisposing arteries to the development of fibrosis and calcification.

References

1. Wilson, P. W. *et al.* Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* **103**, 1529–1534 (2001).
2. Patel, S. D. *et al.* Atherosclerotic Plaque Analysis: A Pilot Study to Assess a Novel Tool to Predict Outcome Following Lower Limb Endovascular Intervention. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* **50**, 487–493 (2015).
3. Herisson, F. *et al.* Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis*. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.004> (2011).
4. Heymann, M.-F. *et al.* Role of the OPG/RANK/RANKL triad in calcifications of the atheromatous plaques: comparison between carotid and femoral beds. *Cytokine* **58**, 300–306 (2012).
5. Dalager, S. *et al.* Artery-related differences in atherosclerosis expression: implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke* **38**, 2698–2705 (2007).
6. Huang, H. *et al.* The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation* **103**, 1051–1056 (2001).
7. Majesky, M. W. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1248–1258 (2007).
8. Leroux-Berger, M. *et al.* Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin. *J. Bone Miner. Res.* **26**(7), 1543–1553 (2011).
9. Diehm, N. *et al.* Association of cardiovascular risk factors with pattern of lower limb atherosclerosis in 2659 patients undergoing angioplasty. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* **31**, 59–63 (2006).
10. Burns, D. M. Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **46**, 11–29 (2003).
11. Aboyans, V., Lacroix, P. & Criqui, M. H. Large and small vessels atherosclerosis: similarities and differences. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **50**, 112–125 (2007).
12. Ladastra, M. *et al.* Femoral and Carotid Subclinical Atherosclerosis Association With Risk Factors and Coronary Calcium: The AWHs Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **67**, 1263–1274 (2016).
13. Hirsch, A. T. *et al.* Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* **286**, 1317–1324 (2001).
14. Criqui, M. H. & Aboyans, V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ. Res.* **116**, 1509–1526 (2015).
15. Fowkes, F. G. R. *et al.* Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* **382**, 1329–1340 (2013).
16. Selvin, E. & Erlinger, T. P. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000. *Circulation* **110**, 738–743 (2004).
17. TASC Steering, C. *et al.* An Update on Methods for Revascularization and Expansion of the TASC Lesion Classification to Include Below-the-Knee Arteries: A Supplement to the Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Vasc. Med. Lond. Engl.* **20**, 465–478 (2015).
18. Armstrong, E. J. *et al.* Adherence to guideline-recommended therapy is associated with decreased major adverse cardiovascular events and major adverse limb events among patients with peripheral arterial disease. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, e000697 (2014).
19. Joosten, M. M. *et al.* Associations between conventional cardiovascular risk factors and risk of peripheral artery disease in men. *JAMA* **308**, 1660–1667 (2012).
20. DeBakey, M. E. & Glaeser, D. H. Patterns of atherosclerosis: effect of risk factors on recurrence and survival-analysis of 11,890 cases with more than 25-year follow-up. *Am. J. Cardiol.* **85**, 1045–1053 (2000).
21. Schillinger, M. *et al.* Sustained benefit at 2 years of primary femoropopliteal stenting compared with balloon angioplasty with optional stenting. *Circulation* **115**, 2745–2749 (2007).
22. Haider, S. N. *et al.* Two-year outcome with preferential use of infrainguinal angioplasty for critical ischemia. *J. Vasc. Surg.* **43**, 504–512 (2006).
23. Li, L.-X. *et al.* Comparison of carotid and lower limb atherosclerotic lesions in both previously known and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Investig.* **5**, 734–742 (2014).
24. Seo, D. *et al.* Gene expression phenotypes of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1922–1927 (2004).
25. Sulkava, M. *et al.* Differentially expressed genes and canonical pathway expression in human atherosclerotic plaques - Tampere Vascular Study. *Sci. Rep.* **7**, 41483 (2017).
26. Davaine, J.-M. *et al.* Osteoprotegerin, pericytes and bone-like vascular calcification are associated with carotid plaque stability. *Plos One* in press.
27. Davaine, J.-M. *et al.* Bone Like Arterial Calcification in Femoral Atherosclerotic Lesions: Prevalence and Role of Osteoprotegerin and Pericytes. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* **51**, 259–267 (2016).
28. Kakisis, J. D. *et al.* The European Society for Vascular Surgery guidelines for carotid intervention: an updated independent assessment and literature review. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* **44**, 238–243 (2012).
29. Tavazoie, S. *et al.* Systematic determination of genetic network architecture. *Nat. Genet.* **22**, 281–285 (1999).
30. de Hoon, M. J. L. *et al.* Open source clustering software. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **20**, 1453–1454 (2004).
31. Saldanha, A. J. Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **20**, 3246–3248 (2004).

32. Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5116–5121 (2001).
33. Ashburner, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **25**, 25–29 (2000).
34. Zeeberg, B. R. *et al.* GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol.* **4**, R28 (2003).
35. Supek, F. *et al.* REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* **6**, e21800 (2011).
36. Niwamae, N. *et al.* Intravascular Ultrasound Analysis of Correlation between Plaque-Morphology and Risk Factors in Peripheral Arterial Disease. *Ann. Vasc. Dis.* **2**, 27–33 (2009).
37. Helck, A. *et al.* Intra-individual comparison of carotid and femoral atherosclerotic plaque features with *in vivo* MR plaque imaging. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **31**, 1611–1618 (2015).
38. Levula, M. *et al.* Genes involved in systemic and arterial bed dependent atherosclerosis—Tampere Vascular study. *PLoS One* **7**, e33787 (2012).
39. Lal, B. K. *et al.* In-stent recurrent stenosis after carotid artery stenting: life table analysis and clinical relevance. *J. Vasc. Surg.* **38**, 1162–1168 (2003). ; discussion 1169.
40. Baumann, F. *et al.* Endovascular treatment of common femoral artery obstructions. *J. Vasc. Surg.* **53**, 1000–1006 (2011).
41. Bonvini, R. F. *et al.* Endovascular treatment of common femoral artery disease: medium-term outcomes of 360 consecutive procedures. *J. Am. Coll. Cardiol.* **58**, 792–798 (2011).
42. Azéma, L. *et al.* Endovascular repair of common femoral artery and concomitant arterial lesions. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* **41**, 787–793 (2011).
43. Gouëffic, Y. *et al.* Stenting or Surgery for De Novo Common Femoral Artery Stenosis. *JACC Cardiovasc. Interv.* **10**, 1344–1354 (2017).
44. Babapulle, M. N. & Eisenberg, M. J. Coated stents for the prevention of restenosis: Part II. *Circulation* **106**, 2859–2866 (2002).
45. Kastrati, A. *et al.* Time course of restenosis during the first year after emergency coronary stenting. *Circulation* **87**, 1498–1505 (1993).
46. Wang, Y. *et al.* Synergistic effects of overexpression of BMP-2 and TGF- β 3 on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol. Med. Rep.* **14**, 5514–5520 (2016).
47. Kearns, A. E. *et al.* Cloning and characterization of a novel protein kinase that impairs osteoblast differentiation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **276**, 42213–42218 (2001).
48. Riessen, R. *et al.* Cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 47–54 (2001).
49. Perisic, L. *et al.* Gene expression signatures, pathways and networks in carotid atherosclerosis. *J. Intern. Med.* **279**, 293–308 (2016).
50. Hulsen, T., de Vlieg, J. & Alkema, W. BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* **9**, 488 (2008).

Acknowledgements

We thank Carine Montagne, Flavien Gautron, and Manon Pondjikli, who were in charge of bio-collection. We are most grateful to the GenoBIRD Core Facility for its technical support. This work was funded by an Allocation Nationale de Recherche (ANR) for physiopathology and by an inter-regional Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC). T. Quillard received financial support from the European commission (Marie Skłodowska-Curie Actions, Individual Fellowships), the Fondation de l'Avenir (Paris, France), the University Hospital of Nantes (CHU Nantes, Nantes, France), and the Fédération Française de Cardiologie (Paris, France).

Author Contributions

O.E. performed and analyzed the histological examinations and patient data correlations with cardiovascular risk factors. M.S. performed and analyzed the microarray experiments with R.H.; B.G. performed statistical analysis on the clinical data; M.F.H. contributed to the histological characterization of plaque content; B.M., M.A.P., and B.O. provided insightful comments during manuscript drafting; M.S., D.H., R.H., and Y.G. contributed to the design and funding of the study and provided insightful comments during manuscript drafting; T.Q. performed and analyzed the histological examinations, prepared the manuscript and contributed to funding of the study. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22292-y>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

4. Etude des Micro RNA dans les processus des calcifications artérielles périphériques

Les résultats des analyses transcriptomiques que nous avons réalisées ont montré qu'il existait un nombre important de gènes avec des expressions différentielles entre les différents territoires, entre les artères pathologiques et calcifiées, et entre les artères saines. Une partie de ces expressions différentielles peut être due à la régulation de miARNs.

Pour tester cette hypothèse nous avons réalisé une étude des miARN pouvant intervenir dans la régulation des calcifications artérielles périphériques. Le croisement de nos données transcriptomique avec un screening des principaux miARN humains nous permettra à la fois de renforcer la pertinence de couples miARN/gènes cible dans les calcifications athéromateuses et l'hétérogénéité artérielle, explorer le rôle intrinsèque des miARN dans ce processus, et nous donnera enfin un autre levier moléculaire pour proposer de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques.

4.1 Matériel et méthodes

Nous avons effectué une analyse de l'expression de 750 microARN au moyen de cartes taqman microfluidiques pour les principaux miARN humains (Taqman Low Density Arrays, Thermo Fischer). Cette étude a été réalisée sur 60 artères : 20 artères carotides pathologiques (10 calcifiées, 10 non calcifiées), 20 artères fémorales pathologiques (toutes calcifiées, 10 ossifiées, 10 non ossifiées), 10 artères carotides saines et 10 artères fémorales saines. Ces mêmes échantillons avaient également été utilisés pour l'analyse transcriptomique.

L'analyse globale des résultats des TLDA a été réalisée avec le logiciel : Expression Suite Software v1.1 (Thermo Fischer).

4.2 Résultats

Nous avons dans un premier temps évalué les miARN qui étaient les plus associés aux calcifications et à l'ossification au sein des artères en distinguant les territoires artériels carotidiens et fémoraux, les échantillons pathologiques fémoraux utilisés étant tous calcifiés. Nous avons également identifié les miARN qui semblent être impliqués aussi bien au niveau des territoires artériels fémoraux que carotidiens. Dans un second temps de l'analyse, nous avons identifié les gènes cibles des miARN ; puis nous avons regroupé ses gènes cibles par grandes fonctions et nous avons identifié des voies faisant intervenir miARN sur des cellules d'intérêt comme cellules musculaires lisses ou sur des voies d'intérêt comme la calcification et l'ossification.

Le niveau d'expression des miARN a été analysé au moyen d'un diagramme de répartition évaluant le niveau d'expression de ces miARN en fonction des territoires calcifiés versus non calcifiés, et ossifiés versus non ossifiés (Figure 30).

Les miARN hsa-miARN-515-3p, hsa-miARN-497, hsa-miARN-136, hsa-miARN-183, hsa-miARN-383, hsa-miARN-518e étaient associés aux calcifications carotidiennes. Les miARN hsa-miARN-127-5p, hsa-miARN-640, hsa-miARN-183, hsa-miARN-155-5p, hsa-miARN-548c étaient associés à l'ossification au niveau des artères fémorales. Ces miARN ont été sélectionnés puisqu'après une recherche bibliographique, il s'agit des miARN qui sont connus pour être impliqués dans les voies signalisations intracellulaires du calcium, ou la différenciation des cellules musculaires lisses. Par ailleurs, les miARN-548c et 1278 ont été sélectionnés puisqu'il s'agit des miARN les plus régulés au sein des artères fémorales ossifiées.

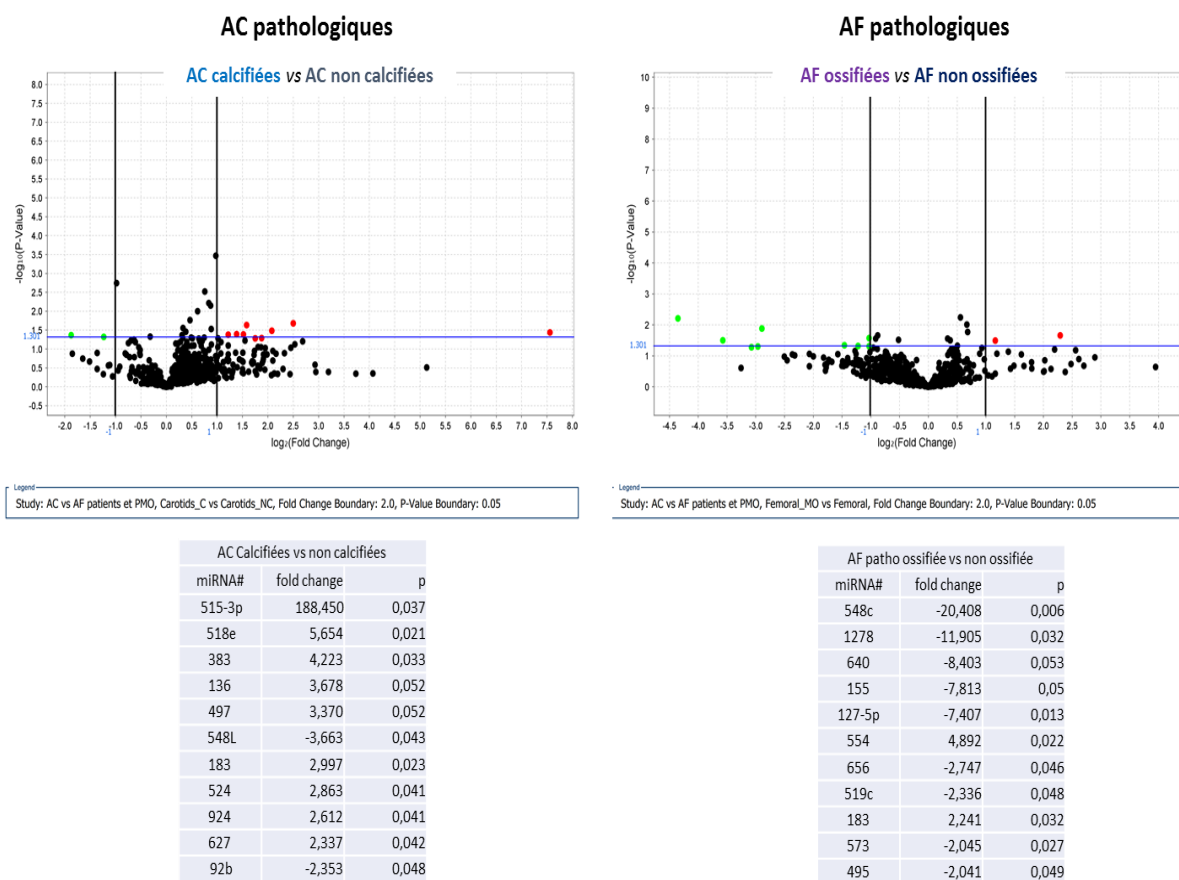


Figure 30 : Diagramme de répartition des miARN au niveau des artères carotides en fonction de la présence ou non de calcifications pariétales et au niveau des artères fémorales en fonction de la présence ou non de plaque d'athérome ossifiée de type métaplasie ostéoïde. Chaque miARN, représenté par un point, est caractérisé selon sa différence d'expression dans la condition calcifiée/ossifiée vs non calcifiée/non ossifiée respectivement en abscisse, et selon la significativité de cette régulation en ordonnée (valeur p statistique). Les miARNs sélectionnés sont les miARN sous exprimés (en vert) et sur exprimés (en rouge) de manière significative ($p \leq 0.05$) avec un facteur supérieur à 2.

Outre ces miARN d'intérêt, nous avons voulu identifier les miARN spécifiques des plaques et du territoire fémoral, susceptibles de développer des calcifications ou des ossifications.

Les stratégies d'identification des miARN associés aux calcifications, à l'ossification, et aux artères fémorales sont présentées dans la figure 31.

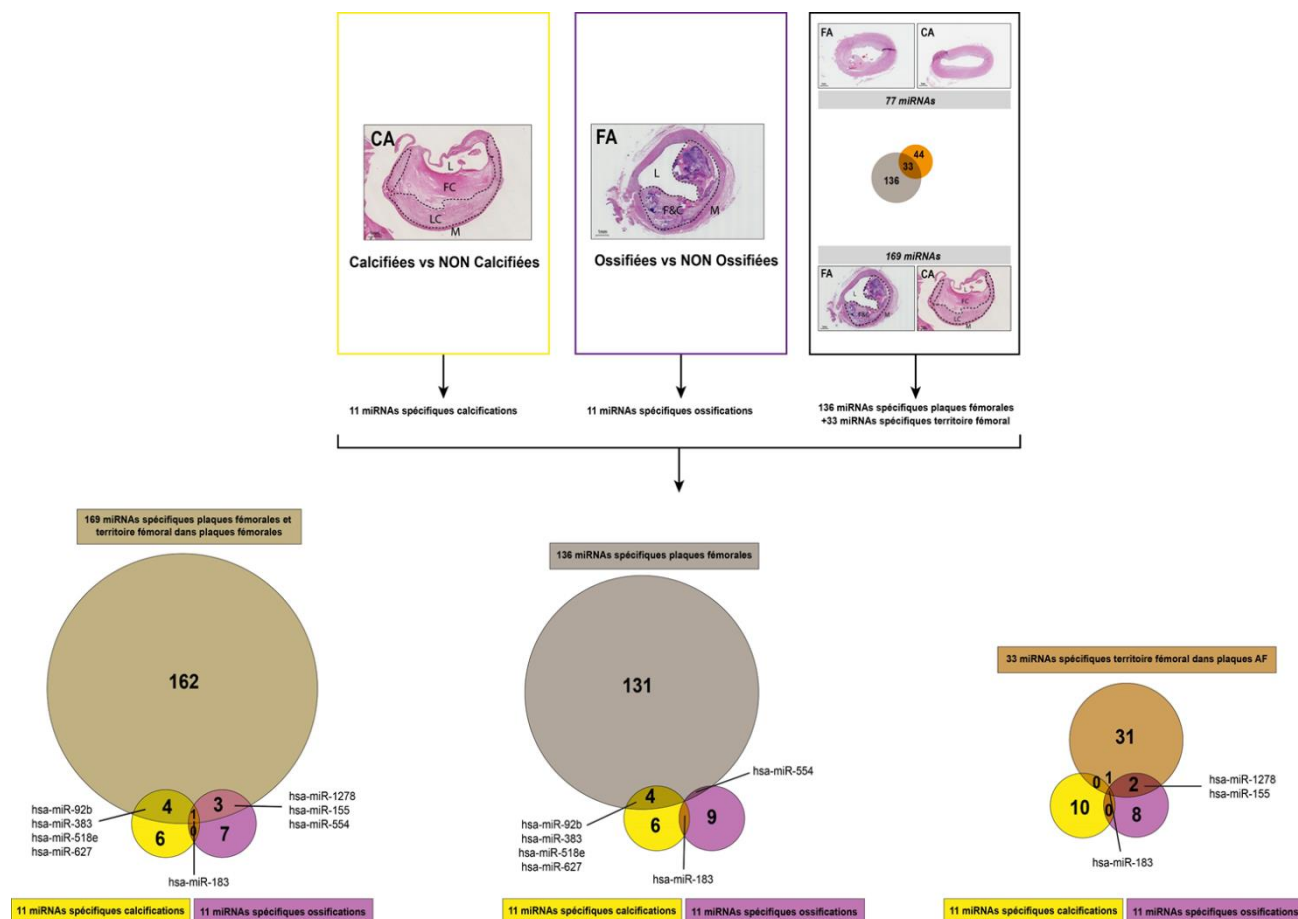
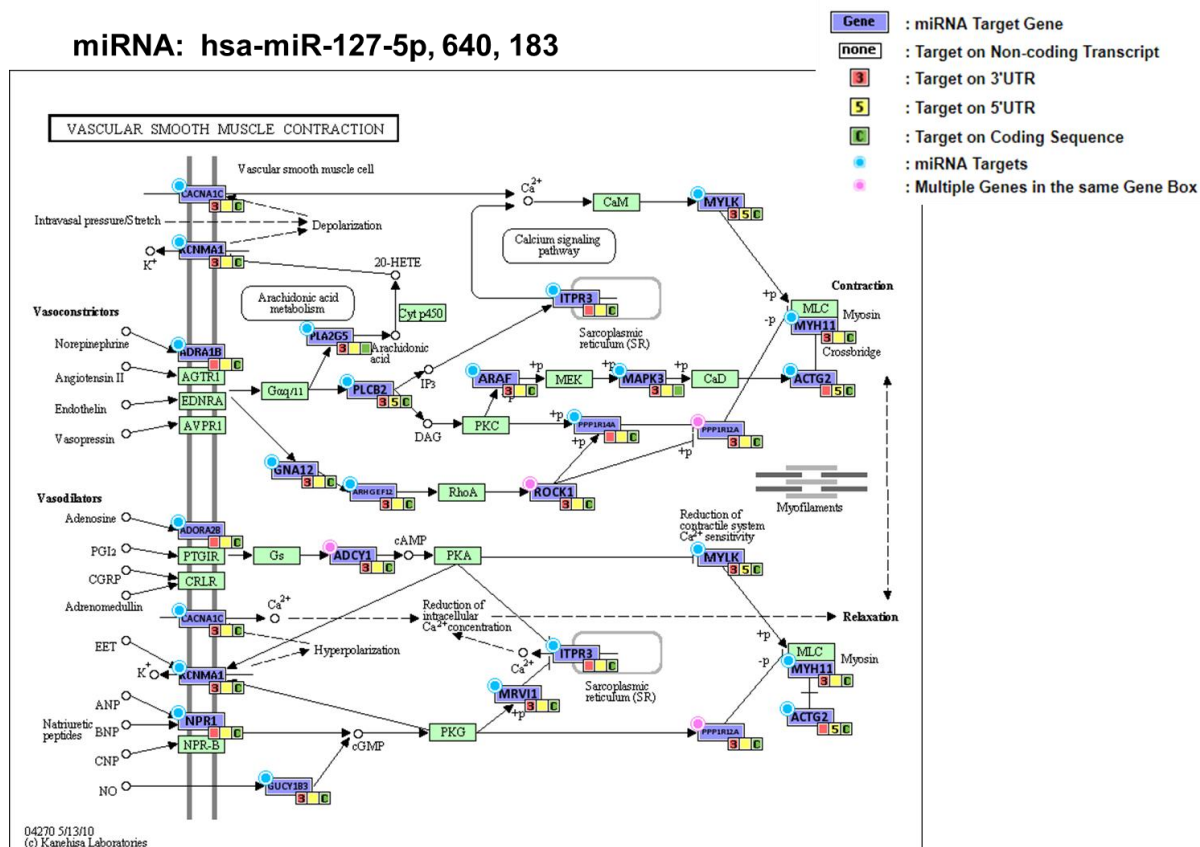


Figure 31 : MiARN spécifiquement exprimés par les calcifications, par les plaques ossifiées et miARN spécifique des plaques fémorales. Diagramme de venn montrant les miARN communs des plaques fémorales, des plaques ossifiées et les plaques calcifiées.

Certains des miARN identifiés et récupérés par ces différentes analyses croisées régulent différents gènes cibles intervenant dans des fonctions biologiques directement associées aux CML vasculaire (Figure 32), ou sur les voies de signalisation du calcium (Figure 33).

miRNA: hsa-miR-127-5p, 640, 183



miRTar (<http://mirtar.mbc.nctu.edu.tw/human/index.php>)

Figure 32: Gène cible interférant avec les miARN 127– 5p, 640,183, effet au niveau de la cellule musculaire lisse avec un effet sur la vasoconstriction ou la vasodilatation.

miRNA: hsa-miR-127-5p, 640, 183

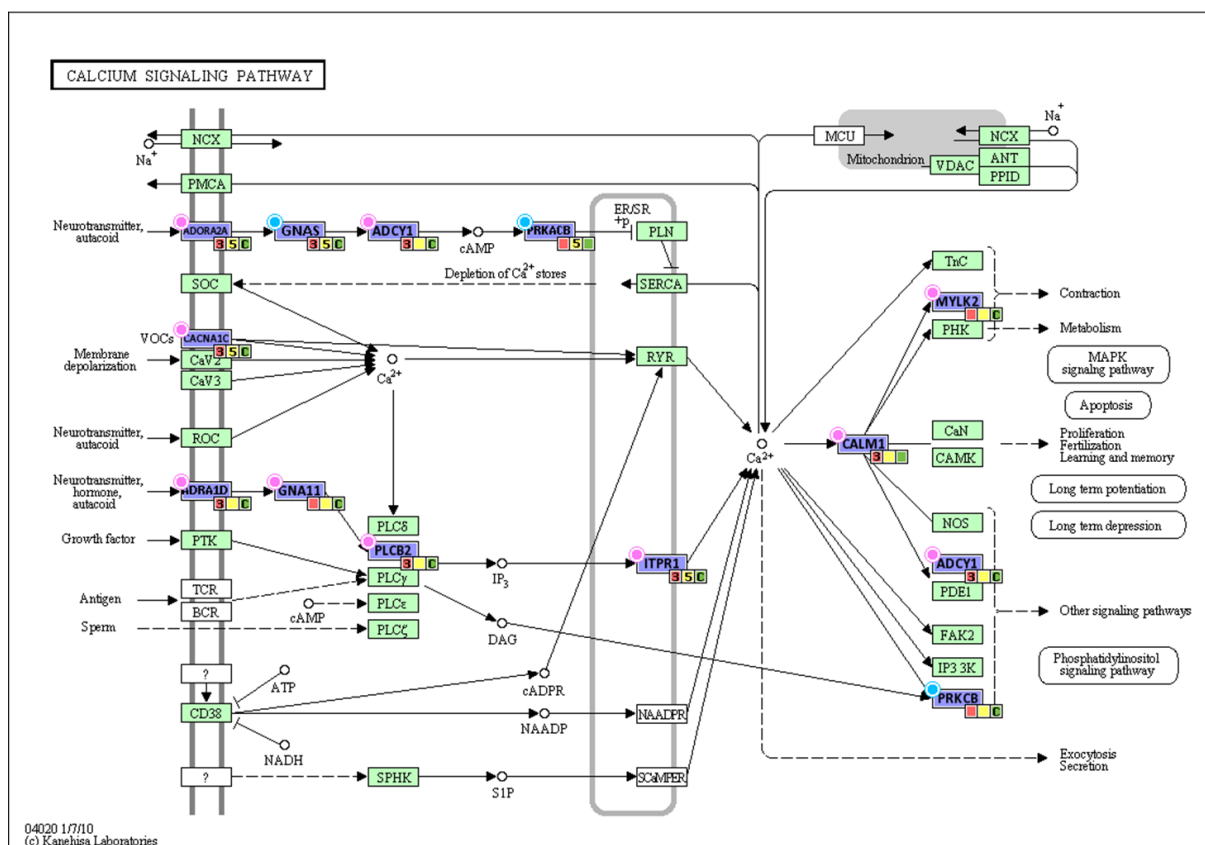


Figure 33 : Gène cible interférant avec les miARN 127-5p, 640,183 intervenants au niveau de la signalisation calcique intracellulaire. En bleu sont représentés les différents gènes cibles de ces miARN.

L'ensemble des gènes cible de ces miARN d'intérêt, référencés par la base de données miRWalk2.0, ont été regroupés en Cluster de grande fonction par l'analyse REVIGO. Lorsque l'on s'intéresse aux artères fémorales ossifiées par rapport aux artères fémorales non ossifiées notamment, on s'aperçoit que les gènes cibles des miARN d'intérêt interviennent au niveau de la résorption osseuse, de la différenciation des cellules mésenchymateuses, de la voie Wnt, confirmant leur rôle potentiel dans les processus de minéralisation. Ils régulent également de façon négative le métabolisme cellulaire, et interviennent dans l'apoptose (Figure 34)

REVIGO (tous les gènes cibles validés selon miRWalk2.0)

AF ossifiées vs AF non ossifiées



Figure 34 : Cluster des grandes fonctions des gènes cible des miARN différentiellement exprimés par les parois des artères fémorales ossifiées.

Nous avons ensuite évalué la probabilité que ces miARN aient un rôle dans la régulation des calcifications des artères périphériques en analysant dans la littérature le lien entre les miARN identifiés et des gènes intervenant dans l'ossification, la minéralisation que nous avons identifiés lors de l'analyse de l'expression génique différentielle dans notre étude transcriptomique.

Les sites suivants référençant les mi-ARN et leurs cibles ont été utilisés pour cette analyse :

<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php> ;

<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/miRpub.html> ;

<http://www.mirdb.org> ; <http://34.236.212.39/microna/home.do>.

Le miARN-1278 pourrait réguler le gène CXCL14 qui intervient dans le chimiotactisme des cellules immunitaires participant à leur recrutement ; le miARN-497 la calponine 1 (CNN1) qui est une protéine cytosquelettique de base des CML, elle régule à la baisse pendant la différenciation des CML vasculaires ; le miARN-136 la substance amyloïde 2 (SAA2) qui intervient dans les processus inflammatoires et le miARN-554 la Phospholipase A2 Groupe VII (PLA2G7) qui est une enzyme modulant l'action du facteur d'activation des plaquettes.

5. Discussion

5.1 Les processus de calcification artériel sont complexes avec des mécanismes communs mais également des différences particulières en fonctions des territoires qui restent à élucider

Ce travail s'est appuyé sur deux biocollections humaines (ECLA et ECLAGEN) de patients avec des plaques d'athérosclérose dans les artères périphériques. Le premier axe de travail a confirmé et étendu les constatations réalisées dans des études précédentes sur les calcifications artérielles périphériques en réunissant les deux biocollections avec une analyse en aveugle standardisée. Ainsi, nous avons constaté l'hétérogénéité des quatre types de calcifications : microcalcifications/ calcifications à centre clair, calcification en feuille, calcification nodulaire et la métaplasie ostéoïde dans 5 localisations anatomiques. A l'instar des études précédentes [254,421], les artères carotides présentaient préférentiellement plus de microcalcification que les autres territoires alors que la métaplasie ostéoïde était largement plus fréquente au niveau des artères fémorales.

Nous avons dans un premier temps évalué le lien entre les facteurs de risque cardiovasculaire conventionnels et les différents types de calcification, puisque les facteurs de risque cardiovasculaire impactent de façon différente les territoires artériels, comme la dyslipidémie au niveau carotidien, ou le diabète et le tabagisme au niveau des artères des membres inférieurs [420], mais aucun de ces facteurs classiques n'était associé un type particulier de calcification ; le seul élément associé aux sous types de calcifications est le territoire artérielle, territoire fémoral pour la métaplasie ostéoïde et territoire carotidien pour les microcalcifications/clear center. L'hypertension artérielle était associée aux calcifications en général, il est difficile de savoir, dans l'état actuel des connaissances, si les calcifications engendrant la rigidité artérielle sont à l'origine de l'hypertension ; ou si l'hypertension est la conséquence de l'augmentation de rigidité artérielle liée aux calcifications. Par la suite, pour expliquer ces différences de calcifications en fonction des territoires artériels, nous avons pratiqué une analyse transcriptomique avec une analyse de l'expression différentielle des gènes. Cette étude a permis de ségréger les artères en fonction de l'origine anatomique par l'expression génique différentielle.

Cette ségrégation transcriptomique en fonction du territoire artériel existe sur les artères athéromateuses comme sur les artères saines.

L'analyse en Cluster de grande fonction a mis en évidence une surexpression forte au niveau des carotides athéromateuses des gènes impliqués dans les processus inflammatoires, de l'immunité innée et adaptative, comme la production d'interleukine-1 et la présentation de l'antigène, dans le stockage des lipides, la résorption osseuse, la matrice extracellulaire et l'apoptose. Alors qu'au niveau des artères fémorales et infra poplitées on observait une régulation importante de gènes en rapport avec la matrice extracellulaire, l'angiogenèse la différenciation ostéoblastique, la minéralisation, la contraction musculaire, la morphologie osseuse ou l'adhésion cellulaire. Ces différences reflètent des compositions de plaques différentes et confirment une récente étude de Sulkava et al [422].

Dans le tissu sain, nous avons été en mesure de révéler une association entre une expression plus élevée dans les carotides et des catégories fonctionnelles associées au système immunitaire. Les gènes qui étaient plus fortement exprimés dans les fémorales des tissus sains étaient principalement impliqués dans le développement des muscles et du squelette. Puis nous avons sélectionné les gènes en rapport avec des calcifications parmi tous les gènes différentiellement exprimés entre territoires sains. Trente-neuf gènes associés à l'os, au cartilage, à la minéralisation ont été sélectionnés. De manière intéressante, l'expression différentielle de ces seuls 39 gènes suffit à ségréger les artères en fonction du territoire carotidien, fémoral ou infra poplitées.

Lorsque l'on fait une analyse plus focale, en regardant l'expression d'un seul gène, on constate que les carotides avec des lésions d'athérosclérose présentaient des niveaux d'expression plus élevés de plusieurs métallopeptidases matricielles (MMP7, MMP12, MMP1 (CA vs. FA) et MMP9 (CA vs. IPA)) et des niveaux d'expression plus faibles de plusieurs gènes homéotiques (HOXA7, HOXA9, HOXC4, HOXC6, HOXC8 et HOXC9). Parmi les 10 gènes les plus différentiellement exprimés dans le tissu sain, quatre gènes ont été exprimés à un niveau plus élevé dans les carotides que dans artères des membres inférieurs : KCNK17, SPINT2, MUTS2 et RBP4. Comme dans les artères athéroscléreuses, plusieurs gènes homéobox (HOXA7, HOXA9, HOXC4, HOXC6, HOXC9 et EMX2) ont été exprimés à un niveau inférieur dans les carotides par rapport aux artères des membres inférieurs dans les artères saines.

Ces données recoupent les travaux de Sulkava et al qui retrouvaient également une hétérogénéité dans l'expression génique en fonction des territoires artériels. Notre étude ainsi que celle des finlandais, ont retrouvé des molécules et des voies de signalisation cellulaires similaires. Sulkava et al ont montré que les gènes les plus régulés entre les artères saines et athéroscléreuse étaient l'ostéopontine et plusieurs MMP, et les plus régulés étaient les

effecteurs de mort cellulaire (CIDEA, CIDEA) et l'apolipoprotéine D. En outre, 156 voies ont été différenciellement exprimées dans les plaques athérosclérotiques, principalement liées à l'inflammation, en particulier liés au trafic et à la signalisation des leucocytes [422].

Dans l'étude finlandaise, MMP 7, 9, 12 et MMP9 comme de façon intéressante PLA2G7 (cible potentielle de miARN d'intérêt) étaient des gènes différenciellement exprimés entre les artères athérosclérotiques et les contrôles artériels thoraciques internes. De plus, lorsque l'on analyse l'expression différentielle génique, on constate que les gènes HOXC6, HOXC8, HOXA5, HOXC4 et HOXA9 sont moins exprimés dans les carotides que dans les fémorales ce qui est tout à fait concordant avec nos résultats. Par ailleurs, les voies canoniques les plus différenciellement exprimées par rapport au contrôle regroupaient les voies la fibrose hépatique, de la maturation des cellules dendritiques, du signal axonal, de l'adhésion et la diapédèse leucocytaire, des interactions entre les cellules dendritiques et les cellules NK, de la présentation d'antigène et l'extravasation leucocytaire. Alors que les voies canoniques différenciellement exprimées au niveau des fémorales par rapport au contrôle était l'extravasation leucocytaire, la fibrose hépatique, la maturation des cellules dendritiques, la présentation d'antigène, l'intervention des macrophages des fibroblastes des cellules endothéliales au cours des processus inflammatoires rhumatismaux, l'adhésion de la diapédèse leucocytaire, le signal TREM1[422].

Cependant la force de notre travail est d'avoir fait des comparaisons entre les différents territoires sur le territoire sain comme pathologique et d'avoir poursuivi les explorations sur les CML isolées de territoire sain, alors que l'équipe finlandaise avait utilisé comme comparateur l'artère thoracique interne.

De manière plus surprenante, des différences importantes ont également été retrouvées pour les artères saines, les artères carotides exprimaient également plus de gènes associés à la réponse immunitaire, au stockage du cholestérol, à l'apoptose et à la résorption osseuse alors que les artères fémorales et infra poplitées exprimaient plus la contraction musculaire et la régionalisation. Le nombre de gène différenciellement exprimés était moindre dans les artères saines que dans les artères pathologiques. Au vu de ces résultats, nous formulons l'hypothèse qu'il est possible que chaque territoire artériel possède une signature génomique propre qui prédispose au développement d'un certain type de plaque d'athérome et d'un certain type de calcification. Ces différences d'identités pourraient être expliquées par des processus épigénétiques en particulier par l'intermédiaire des miARN avec une régulation prédisposant à l'ossification au niveau du territoire fémoral.

Il est envisageable qu'un des fondements de cette hétérogénéité artérielle découle de l'embryogenèse et des processus cellulaires qui y sont associés, puisque les différents territoires artériels ont une origine embryologique distinctes [264], dans cette hypothèse on voit que les gènes HOX associés à la régionalisations, c'est-à-dire la répartition dans l'espace des différents organes et structures physiologiques, sont exprimés de façon différentielle en fonction des territoires, le rôle de ces gènes HOX dans la calcification artérielle est pleinement à étudier.

5.2 Différents types de plaques et différents types de calcifications

Pour expliquer la présence de différents types de calcifications artérielles, microcalcifications, calcifications nodulaires, calcifications en feuillets, métaplasie ostéoïde, plusieurs hypothèses sont possibles :

Une des hypothèses est que la formation de calcifications artérielles reproduit l'ossification physiologique, la présence d'un tissu ostéoïde dans une lésion artérielle serait la forme la plus aboutie de la minéralisation. Elle pourrait refléter un processus évoluant de longue date d'abord par une minéralisation peu structurée puis évoluerait vers un tissu minéral plus complexe avec une forme organisée [281].

Plusieurs types de calcifications artérielles peuvent préexister au sein d'une même lésion d'athérosclérose. La métaplasie ostéoïde n'étant pas la calcification qui prédomine dans la lésion athérosclérotique. Cette hypothèse suggère que les autres types de calcifications sont des formes moins évoluées qui ne serait pas encore au stade de la métaplasie ostéoïde. Environ 15 à 20% des valves et des vaisseaux calcifiés contiennent de l'os trabéculaire complexe sur le plan architectural [179,337,423,424]. Il n'est pas certain qu'il existe un continuum entre les différents types de plaques. Sur les données de notre travail comme dans celui de Dalager et al.[425] nous formulons l'hypothèse que les plaques sont différentes en fonction des territoires et qu'elles ne passent pas par tous les types de calcifications. En effet, dans notre biocollection nous n'avons que très rarement retrouvé des microcalcifications au niveau des artères fémorales alors que les calcifications en feuille et nodulaires étaient fortement représentées suggérant des mécanismes de calcification différents au niveau des plaques avec des évolutions différentes selon les territoires ; cette hypothèse reste à démontrer.

La minéralisation du tissu et des plaques pourraient être le produit de plusieurs mécanismes qui peuvent coexister au sein d'une même paroi artérielle calcifiée [260,426,427]. Dans cette hypothèse, les vésicules matricielles et les corps apoptotiques issus des cellules de la plaque formeraient un environnement propice à l'agrégation de cristaux et à la minéralisation. Cet environnement pourrait induire la différenciation ostéogénique de précurseurs cellulaires environnants. La calcification artérielle est, ainsi, un processus actif contrôlé par des cellules qui favorisent l'ossification par l'expression de facteurs de croissance ostéogéniques, de protéines matricielles et d'autres molécules apparentées aux ostéoblastes dans les tissus squelettiques [428–430]. Ces processus faisant intervenir les vésicules matricielles et différents types cellulaires peuvent être d'une part responsable de la présence des différents sous-types de calcifications par des interactions distinctes qui dépendent de l'environnement cytokinique mais également des contraintes hémodynamiques. Ainsi, on peut s'interroger sur la présence d'ossification au niveau de l'intima des artères fémorales, les procédés qui sous-tendent à la métaplasie ostéoïde font peut-être partie de l'identité biologique des artères fémorales dans des conditions rhéologiques et cytokiniques particulières.

L'origine des cellules de type ostéoblastique dans la calcification vasculaire est controversée, mais une possibilité est que ces cellules proviennent de la paroi du vaisseau lui-même. Ces cellules, également connues sous le nom de cellules vasculaires calcifiantes (CVC), se sont avérées donner naissance à de multiples lignées de cellules mésenchymateuses, y compris des ostéoblastes [430–432]. Alternativement, les cellules de type ostéoblastique pourraient provenir de précurseurs mésenchymateux circulants endogènes tels que certaines sous-populations de monocytes CD14 ayant un potentiel similaire [433]. D'autres équipes ont suggéré que la migration des péricytes adventitiels ou des myofibroblastes dans la paroi vasculaire représente la population de cellules minéralisantes dans la calcification artérielle au cours du diabète [282,434]. Une autre possibilité est que les cellules endothéliales elles-mêmes subissent une transition endothéliale-mésenchymateuse et une différenciation ostéogénique [342,435,436]. Les CML peuvent également participer à ces processus de calcification car elles sont capables d'adopter un certain nombre de phénotypes, y compris des phénotypes procalcifiant (ostéogéniques, chondrocytaires, ostéoclastes), adipogéniques et macrophagiques [268].

La calcification intima athéroscléreuse, de loin, la forme la plus prévalente de vasculopathie calcifiante, peut procéder à l'ossification vasculaire par un processus d'ossification endochondrale [437]. Initialement, les oxylipides inflammatoires et les oxystérols dérivés du cholestérol LDL et du peroxyde d'hydrogène s'accumulent aux niveaux sous-intimaux

conduisent à une calcification intinale athérosclérotique en activant la BMP2 ostéogénique et la trans-différenciation Runx2 / Cbfa1 des CML vasculaires en chondrocytes et ostéoblastes [221,281,428]. Le recrutement de CVC fournirait une source supplémentaire d'ostéoprogéniteurs [191]. Les CML vasculaires et les CVC produisent des vésicules matricielles minéralisantes et des corps apoptotiques qui favorisent la minéralisation [427,438,439]. Il a été montré que les artères calcifiées et les cellules vasculaires cultivées expriment des protéines de la matrice osseuse et des facteurs régulateurs tels que ostéopontine, MGP, sialoprotéine osseuse, ostéonectine, collagène I et ostéocalcine [440–443].

Il semble plausible que les plaques ossifiées soient structurellement plus stables et donc moins sujettes à la rupture de la plaque [179]. De même, il a été proposé que l'ossification se produit comme un mécanisme adaptatif pour englober les sites inflammatoires afin de limiter la propagation des processus nocifs et protéger les tissus voisins [440]. Les plaques ossifiées pourraient avoir un rôle indirect sur l'hypertension artérielle, en raison de la rigidification de la paroi vasculaire, cette majoration de la pression artérielle augmente le stress mécanique sur les autres plaques avec un potentiel risque de déstabilisation.

Il semble également important de distinguer les calcifications intinales et médiales puisqu'elles surviennent dans des artères de calibre de différents, elles ne sont pas favorisées par les mêmes facteurs de risque cardiovasculaire. Les calcifications intinales résulteraient d'un processus proche de l'ossification alors que les calcifications médiales rencontrées le plus souvent au cours de l'insuffisance rénale chronique, du diabète seraient secondaires à des troubles du métabolisme phosphocalcique [209,374,444]. Les calcifications médiales sont sur le plan morphologique très proche des calcifications en feuille que nous avons retrouvé au cours de ce travail. En outre, il existe une interrelation entre le métabolisme phosphocalcique et les calcifications vasculaires puisque certains travaux ont mis en évidence que l'ostéoporose était un facteur de risque indépendant de calcifications de l'aorte abdominale est de risque d'augmentation d'épaisseur intima média au niveau des carotides [445].

Il existe de fortes similarités entre le tissu osseux et formation des ossifications artérielles, cependant ces tissus ne sont pas soumis aux mêmes contraintes mécaniques. Ces contraintes mécaniques influent fortement sur l'aspect, l'organisation du tissu osseux, les ostéocytes des fémurs ont une organisation différente de ceux présents au niveau des os du crâne. Ceci suggère que si les mécanismes conduisant à la formation du tissu minéralisés sont similaires

dans les artères et dans le tissu osseux, l'organisation finale du tissu minéralisé peut-être tout à fait différente en fonction des contraintes locales propres à chaque tissu.

5.3 Evaluation de l'implication du TGFβ dans le processus de calcification des artères fémorales.

Nous avons mieux estimé le lien entre les types de cellules et les calcifications en analysant leur proximité spatiale. Les calcifications en feuille se développent principalement à proximité des parties fibreuses riches en CML, tandis que les macrophages se trouvent souvent à proximité ou en contact direct avec les nodules calcifiés, suggérant une implication directe de ces types de cellules dans leur formation respective. La localisation rapprochée des CML et des calcifications médiales des plaques chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique plaide en faveur d'un rôle direct de la CML dans la minéralisation, fort de leur capacité à se transdifférencier en cellules ostéoblastiques.

Les CML vasculaires fémorales montrent une propension plus importante à minéraliser par rapport aux autres territoires. Cette capacité différentielle à minéraliser est également reflétée par une augmentation marquée de l'expression des marqueurs ostéoblastiques (runx2, phosphatase alcaline, ostéopontine) dans la CML vasculaire fémorale par rapport à d'autres lits artériels. Les capacités de minéralisation des CML étaient en corrélation avec l'étendue de la calcification de la plaque observée dans les lésions des patients, suggérant que les susceptibilités spécifiques des CML à minéraliser pourraient directement contribuer à l'hétérogénéité de la calcification athéromateuse dans les artères périphériques. Ces résultats laissent à penser qu'il existe une hétérogénéité phénotypique au sein des CML vasculaires, il est possible qu'elles aient une hétérogénéité intrinsèque qui dépend d'une part du territoire artériel mais également de facteurs locaux comme l'hémodynamique.

L'analyse transcriptomique a montré que certains gènes étaient régulés à la baisse dans les artères fémorales. Ce groupe contenait des gènes impliqués dans l'ossification et la localisation des lipides. Par ailleurs, d'autres gènes étaient spécifiquement surexprimés dans les artères fémorales par rapport aux autres lits vasculaires, nous avons trouvé 19 membres de la signalisation TGFβ. Ceci suggère que la signalisation TGFβ pourrait jouer un rôle dans les capacités de minéralisation des CML en fonction de leur origine anatomique. Le TGFβ est en particulier un régulateur clé du commutateur phénotypique des CML conduisant à la

migration de CML, à la prolifération, à la production de matrice, mais aussi à la minéralisation [29,44,45].

L'analyse qPCR dans les CML fémorales a confirmé le rôle de TGF β R1 et de molécules apparentées à la signalisation de TGF β (smad7, serpine, bambi), dans les processus de calcification.

Le TGF β a déjà été rapporté dans le processus de minéralisation cellulaire et la transdifférenciation des cellules vasculaires dans les cellules ostéoblastiques [27-29], nous avons postulé qu'une forte propension des cellules fémorales à se minéraliser pourrait dériver d'une présence accrue de la signalisation TGF β . Nous avons montré que l'utilisation d'un inhibiteur du TGF β était suffisante pour prévenir efficacement la minéralisation des cellules fémorales, mais pas pour les CML carotidiennes, confirmant un rôle spécifique de la signalisation du TGF β dans la minéralisation CML d'une manière dépendante anatomique.

Les études cliniques montrent des différences dans le comportement des territoires artériels en terme de resténose intrastent : au niveau des artères carotidiennes les resténoses intrastent surviennent dans 3,4% des cas [446] ; alors que les taux de resténose après l'implantation d'un stent de l'artère fémorale superficielle sont de 30% à 40% (en particulier la resténose tardive) [447]. Les calcifications peuvent influencer sur les resténose intrastent, ainsi, les calcifications présentes au niveau du bulbe carotidien seraient un facteur modérément protecteur de la resténose [448,449]. Par ailleurs, certains travaux fondamentaux sur des stent imprégnés de « gene silencer pyrrole-imidazole » qui est un inhibiteur du TGF β 1 ont montré une réduction de l'hyperplasie intimale [450]. Actuellement, les prises en charges interventionnelles des plaques carotidiennes et fémorales utilisent des matériels différents, que ce soit en termes de ballon d'angioplastie ou de stent. Ces pratiques sont en lien avec les caractéristiques propres de chaque territoire. Il est tout à fait possible d'imaginer, que dans un avenir proche, les matériels de traitement endovasculaire des lésions artérielles périphériques soient imprégnés de substances pharmacoactives différentes selon les territoires, en lien avec leurs expressions moléculaires. Des thérapeutiques systémiques utilisant la voie du TGF ne semblent pas envisageables pour le moment en raison du caractère pléiotrope de cette voie qui intervient dans très nombreuses fonctions cellulaires et dont l'effet systémique serait délétère. Cependant une utilisation locale peut être envisagée à condition que la substance ne diffuse pas du site opératoire.

5.4 Elements apportés par ce travail

On observe une hétérogénéité à différents niveaux ; d'une part une hétérogénéité dans le type de plaque d'athérosclérose avec certaines plus ou moins riche en lipides, plus ou moins infiltrées par des cellules inflammatoires, plus ou moins fibreuses et plus ou moins calcifiées ; d'autre part une hétérogénéité dans le type de calcification des plaques avec quatre grand sous-types. Il existe également une hétérogénéité au sein des artères saines et des CML vasculaires issues de ces territoires, puisqu'ils certains gènes et miARN sont différentiellement exprimés en fonction de la localisation anatomique. Ces différences d'expression génique et épigéniques sont responsables de susceptibilités différentes des artères à minéraliser et à calcifier.

5.3 Perspectives

Il est probable qu'il existe différents processus moléculaires à l'origine des calcifications artérielles. Ces processus sont très vraisemblablement distincts en fonction des territoires artériels. Cette notion pourrait avoir des développements en pratique clinique. Ainsi, une meilleure connaissance des processus de calcification permettrait d'imprégner le matériel d'angioplastie de différentes substances par pharmaco-actives qui permettraient de réduire les resténoses et limiter voir de résorber les calcifications.

De la même façon, des stents imprégnés de certains principes actifs pourraient être testés dans des bioréacteurs pour suivre la resténose ou l'endothélialisation en fonction des territoires.

L'environnement, dans lequel se développe les calcifications et les processus d'ossification de la paroi artérielle, est un autre élément important en prendre en compte ; il faudra caractériser les liens entre les compartiment osseux et vasculaire, à l'instar des travaux qui ont déjà été réalisés au cours de l'ostéoporose pour mieux appréhender le rôle de chaque voie intervenant dans le métabolisme phosphocalcique et dans la genèse des calcifications artérielles périphériques.

6. Bibliographie

- 1 Espitia O, Chatelais M, Steenman M, Charrier C, Maurel B, Georges S, Houlgatte R, Verrecchia F, Ory B, Lamoureux F, Heymann D, Gouëffic Y, Quillard T. Implication of molecular vascular smooth muscle cell heterogeneity among arterial beds in arterial calcification. *PLoS One* 2018; **13**: e0191976.
- 2 Steenman M, Espitia O, Maurel B, Guyomarch B, Heymann M-F, Pistorius M-A, Ory B, Heymann D, Houlgatte R, Gouëffic Y, Quillard T. Identification of genomic differences among peripheral arterial beds in atherosclerotic and healthy arteries. *Sci Rep* 2018; **8**: 3940.
- 3 Catala M, Katasanis G, Poirier J. Histologie : Organe, systèmes et appareils. 2007.
- 4 Fawcett D. Histologie - L'essentiel. Maloine; 2002. p. 199–201.
- 5 Bonnet. Athérosclérose. EMC - Cardiologie Angéiologie; 2005. p. 2:436-58.
- 6 Finn C, Giambrone AE, Gialdini G, Delgado D, Baradaran H, Kamel H, Gupta A. The Association between Carotid Artery Atherosclerosis and Silent Brain Infarction: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc* 2017; **26**: 1594–601.
- 7 Wheater PR, Young B, O'Dowd, G, Phillip Woodford P. Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater. De Boeck Supérieur; 2015.
- 8 Anitschkow N. Über Veränderungen der Kaninchen-Aorta bei experimentelle Cholesterinsteatose. *Beitr. Path. Anat.* 1913; : 56, 379–391.
- 9 Virchow R. Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicine. Meidinger & Sohn Corp. 1856.
- 10 Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; **340**: 115–26.
- 11 GBD 2016 DALYs and HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Lond Engl* 2017; **390**: 1260–344.
- 12 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; **352**: 1685–95.
- 13 Skålen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002; **417**: 750–4.
- 14 Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 551–61.
- 15 Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; **473**: 317–25.
- 16 Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011; **12**: 204–12.

- 17 Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 3893–7.
- 18 Frostegård J, Ulfgrén AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; **145**: 33–43.
- 19 Moss JW, Ramji DP. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. *Future Med Chem* 2016; **8**: 1317–30.
- 20 Quillard T, Araújo HA, Franck G, Shvartz E, Sukhova G, Libby P. TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion. *Eur Heart J* 2015; **36**: 1394–404.
- 21 Andrews J, Psaltis PJ, Bartolo BAD, Nicholls SJ, Puri R. Coronary arterial calcification: A review of mechanisms, promoters and imaging. *Trends Cardiovasc Med* 2018; .
- 22 Liu W, Zhang Y, Yu C-M, Ji Q-W, Cai M, Zhao Y-X, Zhou Y-J. Current understanding of coronary artery calcification. *J Geriatr Cardiol JGC* 2015; **12**: 668–75.
- 23 Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, Preuss M, Stewart AFR, Barbalic M, Gieger C, Absher D, Aherrahrou Z, Allayee H, Altshuler D, Anand SS, Andersen K, Anderson JL, Ardisson D, Ball SG, Balmforth AJ, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2011; **43**: 333–8.
- 24 Harismendy O, Notani D, Song X, Rahim NG, Tanasa B, Heintzman N, Ren B, Fu X-D, Topol EJ, Rosenfeld MG, Frazer KA. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon- γ signalling response. *Nature* 2011; **470**: 264–8.
- 25 Lusis AJ. Genetics of atherosclerosis. *Trends Genet TIG* 2012; **28**: 267–75.
- 26 Davies RW, Wells GA, Stewart AFR, Erdmann J, Shah SH, Ferguson JF, Hall AS, Anand SS, Burnett MS, Epstein SE, Dandona S, Chen L, Nahrstaedt J, Loley C, König IR, Kraus WE, Granger CB, Engert JC, Hengstenberg C, Wichmann H-E, et al. A genome-wide association study for coronary artery disease identifies a novel susceptibility locus in the major histocompatibility complex. *Circ Cardiovasc Genet* 2012; **5**: 217–25.
- 27 Swanberg M, Lidman O, Padyukov L, Eriksson P, Akesson E, Jagodic M, Lobell A, Khademi M, Börjesson O, Lindgren CM, Lundman P, Brookes AJ, Kere J, Luthman H, Alfredsson L, Hillert J, Klareskog L, Hamsten A, Piehl F, Olsson T. MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet* 2005; **37**: 486–94.
- 28 Björkbacka H, Lavant EH, Fredrikson GN, Melander O, Berglund G, Carlson JA, Nilsson J. Weak associations between human leucocyte antigen genotype and acute myocardial infarction. *J Intern Med* 2010; **268**: 50–8.
- 29 Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, Zhao L, Trehan S, Schwobe EP, Carlquist JF. Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. *Circulation* 1998; **97**: 633–6.
- 30 Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Porritt RA, Crother TR, Shimada K, Tarling EJ, Erbay E, Arditi M, Chen S. *Chlamydia pneumoniae* Hijacks a Host Autoregulatory IL-1 β Loop to Drive Foam Cell Formation and Accelerate Atherosclerosis. *Cell Metab* 2018; .

- 31 Lantos I, Endr sz V, Virok DP, Szab  A, Lu X, Mosolyg  T, Buri n K. Chlamydia pneumoniae Infection Exacerbates Atherosclerosis in ApoB100only/LDLR-/- Mouse Strain. *BioMed Res Int* 2018; **2018**: 8325915.
- 32 Caligiuri G, Rottenberg M, Nicoletti A, Wigzell H, Hansson GK. Chlamydia pneumoniae infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. *Circulation* 2001; **103**: 2834–8.
- 33 Wright SD, Burton C, Hernandez M, Hassing H, Montenegro J, Mundt S, Patel S, Card DJ, Hermanowski-Vosatka A, Bergstrom JD, Sparrow CP, Detmers PA, Chao YS. Infectious agents are not necessary for murine atherogenesis. *J Exp Med* 2000; **191**: 1437–42.
- 34 Andraws R, Berger JS, Brown DL. Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005; **293**: 2641–7.
- 35 Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiol Oxf Engl* 2017; **219**: 382–408.
- 36 Reinhart-King CA, Fujiwara K, Berk BC. Physiologic stress-mediated signaling in the endothelium. *Methods Enzymol* 2008; **443**: 25–44.
- 37 Zhou J, Li Y-S, Chien S. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; **34**: 2191–8.
- 38 Heo K-S, Fujiwara K, Abe J. Shear stress and atherosclerosis. *Mol Cells* 2014; **37**: 435–40.
- 39 Davies PF, Civelek M, Fang Y, Fleming I. The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovasc Res* 2013; **99**: 315–27.
- 40 Chiu J-J, Usami S, Chien S. Vascular endothelial responses to altered shear stress: pathologic implications for atherosclerosis. *Ann Med* 2009; **41**: 19–28.
- 41 Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; **316**: 1371–5.
- 42 Kr ner ESJ, van Velzen JE, Boogers MJ, Siebelink H-MJ, Schalij MJ, Kroft LJ, de Roos A, van der Wall EE, Jukema JW, Reiber JHC, Schuijf JD, Bax JJ. Positive remodeling on coronary computed tomography as a marker for plaque vulnerability on virtual histology intravascular ultrasound. *Am J Cardiol* 2011; **107**: 1725–9.
- 43 Alviar CL, Tellez A, Wallace-Bradley D, Lopez-Berestein G, Sanguino A, Schulz DG, Builes A, Ballantyne CM, Yang C-Y, Kaluza GL, Granada JF. Impact of adventitial neovascularisation on atherosclerotic plaque composition and vascular remodelling in a porcine model of coronary atherosclerosis. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol* 2010; **5**: 981–8.
- 44 Okura H, Kobayashi Y, Sumitsuji S, Terashima M, Kataoka T, Masutani M, Ohyanagi M, Shimada K, Taguchi H, Yasuga Y, Takeda Y, Ohashi Y, Awano K, Fujii K, Mintz GS. Effect of culprit-lesion remodeling versus plaque rupture on three-year outcome in patients with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2009; **103**: 791–5.
- 45 Kashiwagi M, Tanaka A, Kitabata H, Tsujioka H, Matsumoto H, Arita Y, Ookochi K, Kuroi A, Kataiwa H, Tanimoto T, Ikejima H, Takarada S, Kubo T, Hirata K, Nakamura N, Mizukoshi M, Imanishi T, Akasaka T. Relationship between coronary arterial remodeling, fibrous cap thickness

and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients with acute coronary syndrome. *Circ J Off J Jpn Circ Soc* 2009; **73**: 1291–5.

- 46 Antoniadis AP, Stone PH. Evolving understanding of the heterogeneous natural history of individual coronary artery plaques and the role of local endothelial shear stress. *Curr Opin Cardiol* 2017; **32**: 748–54.
- 47 Stone PH, Saito S, Takahashi S, Makita Y, Nakamura S, Kawasaki T, Takahashi A, Katsuki T, Nakamura S, Namiki A, Hirohata A, Matsumura T, Yamazaki S, Yokoi H, Tanaka S, Otsuji S, Yoshimachi F, Honye J, Harwood D, Reitman M, et al. Prediction of progression of coronary artery disease and clinical outcomes using vascular profiling of endothelial shear stress and arterial plaque characteristics: the PREDICTION Study. *Circulation* 2012; **126**: 172–81.
- 48 Asakura T, Karino T. Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ Res* 1990; **66**: 1045–66.
- 49 Giannoglou GD, Soulis JV, Farmakis TM, Farmakis DM, Louridas GE. Haemodynamic factors and the important role of local low static pressure in coronary wall thickening. *Int J Cardiol* 2002; **86**: 27–40.
- 50 Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 1999; **282**: 2035–42.
- 51 Stone PH, Coskun AU, Kinlay S, Popma JJ, Sonka M, Wahle A, Yeghiazarians Y, Maynard C, Kuntz RE, Feldman CL. Regions of low endothelial shear stress are the sites where coronary plaque progresses and vascular remodelling occurs in humans: an in vivo serial study. *Eur Heart J* 2007; **28**: 705–10.
- 52 Chatzizisis YS, Jonas M, Coskun AU, Beigel R, Stone BV, Maynard C, Gerrity RG, Daley W, Rogers C, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Prediction of the localization of high-risk coronary atherosclerotic plaques on the basis of low endothelial shear stress: an intravascular ultrasound and histopathology natural history study. *Circulation* 2008; **117**: 993–1002.
- 53 Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol* 2007; **49**: 2379–93.
- 54 Kubo T, Maehara A, Mintz GS, Doi H, Tsujita K, Choi S-Y, Katoh O, Nasu K, Koenig A, Pieper M, Rogers JH, Wijns W, Böse D, Margolis MP, Moses JW, Stone GW, Leon MB. The dynamic nature of coronary artery lesion morphology assessed by serial virtual histology intravascular ultrasound tissue characterization. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**: 1590–7.
- 55 Koskinas KC, Feldman CL, Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Maynard C, Baker AB, Papafakis MI, Edelman ER, Stone PH. Natural history of experimental coronary atherosclerosis and vascular remodeling in relation to endothelial shear stress: a serial, in vivo intravascular ultrasound study. *Circulation* 2010; **121**: 2092–101.
- 56 Koskinas KC, Sukhova GK, Baker AB, Papafakis MI, Chatzizisis YS, Coskun AU, Quillard T, Jonas M, Maynard C, Antoniadis AP, Shi G-P, Libby P, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Thin-capped atheromata with reduced collagen content in pigs develop in coronary arterial regions exposed to persistently low endothelial shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; **33**: 1494–504.
- 57 Chatzizisis YS, Baker AB, Sukhova GK, Koskinas KC, Papafakis MI, Beigel R, Jonas M, Coskun AU, Stone BV, Maynard C, Shi G-P, Libby P, Feldman CL, Edelman ER, Stone PH. Augmented expression and activity of extracellular matrix-degrading enzymes in regions of low endothelial

- shear stress colocalize with coronary atheromata with thin fibrous caps in pigs. *Circulation* 2011; **123**: 621–30.
- 58 Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, de Bruyne B, Cristea E, Mintz GS, Mehran R, McPherson J, Farhat N, Marso SP, Parise H, Templin B, White R, Zhang Z, Serruys PW, PROSPECT Investigators. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011; **364**: 226–35.
 - 59 Stone PH, Maehara A, Coskun AU, Maynard CC, Zaromytidou M, Siasos G, Andreou I, Fotiadis D, Stefanou K, Papafaklis M, Michalis L, Lansky AJ, Mintz GS, Serruys PW, Feldman CL, Stone GW. Role of Low Endothelial Shear Stress and Plaque Characteristics in the Prediction of Nonculprit Major Adverse Cardiac Events: The PROSPECT Study. *JACC Cardiovasc Imaging* 2018; **11**: 462–71.
 - 60 De Meyer GR, Herman AG. Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; **39**: 325–42.
 - 61 Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; **87**: 840–4.
 - 62 Cohen RA, Tong X. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; **55**: 308–16.
 - 63 Vanhoutte PM, Zhao Y, Xu A, Leung SWS. Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circ Res* 2016; **119**: 375–96.
 - 64 Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999; **31**: 23–37.
 - 65 Kyle BD, Braun AP. The regulation of BK channel activity by pre- and post-translational modifications. *Front Physiol* 2014; **5**: 316.
 - 66 Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, Arnao V, Pinto A, Licata G. Atherosclerosis as an inflammatory disease. *Curr Pharm Des* 2012; **18**: 4266–88.
 - 67 Pentikäinen MO, Oörni K, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. *J Intern Med* 2000; **247**: 359–70.
 - 68 Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**: 709–21.
 - 69 Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WG (Jay), Linton EF, Vickers KC. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
 - 70 Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; **251**: 788–91.
 - 71 Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 842–51.
 - 72 Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014; **14**: 392–404.

- 73 Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, Ivanov S, Duan Q, Bala S, Condon T, van Rooijen N, Grainger JR, Belkaid Y, Ma'ayan A, Riches DWH, Yokoyama WM, Ginhoux F, Henson PM, Randolph GJ. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 2013; **39**: 599–610.
- 74 Miteva K, Pappritz K, El-Shafeey M, Dong F, Ringe J, Tschöpe C, Van Linthout S. Mesenchymal Stromal Cells Modulate Monocytes Trafficking in Cocksackievirus B3-Induced Myocarditis. *Stem Cells Transl Med* 2017; **6**: 1249–61.
- 75 Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F, Habenicht AJR, Ziegler-Heitbrock L, Randolph GJ. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 2010; **115**: e10-19.
- 76 Fowler S, Shio H, Haley NJ. Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed rabbits. IV. Investigation of macrophage-like properties of aortic cell populations. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 1979; **41**: 372–8.
- 77 Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo J-L, Gorbato R, Sukhova GK, Gerhardt LMS, Smyth D, Zavitz CCJ, Shikatani EA, Parsons M, van Rooijen N, Lin HY, Husain M, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 2013; **19**: 1166–72.
- 78 Wang Y, Wang W, Wang N, Tall AR, Tabas I. Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Atherosclerosis and Neutrophil Extracellular Traps in Aged Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; **37**: e99–107.
- 79 Porcheray F, Viaud S, Rimaniol A-C, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005; **142**: 481–9.
- 80 Van den Bossche J, O'Neill LA, Menon D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends Immunol* 2017; **38**: 395–406.
- 81 Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff THM. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 4560–5.
- 82 Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; **25**: 677–86.
- 83 Anderson CF, Gerber JS, Mosser DM. Modulating macrophage function with IgG immune complexes. *J Endotoxin Res* 2002; **8**: 477–81.
- 84 Liberale L, Dallegri F, Montecucco F, Carbone F. Pathophysiological relevance of macrophage subsets in atherogenesis. *Thromb Haemost* 2017; **117**: 7–18.
- 85 Feig JE, Rong JX, Shamir R, Sanson M, Vengrenyuk Y, Liu J, Rayner K, Moore K, Garabedian M, Fisher EA. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 7166–71.
- 86 Libby P, Aikawa M, Schönbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1529**: 299–309.

- 87 Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; **464**: 1357–61.
- 88 Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, Miller YI. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ Res* 2009; **104**: 210–8, 21p following 218.
- 89 Hirose K, Iwabuchi K, Shimada K, Kiyanagi T, Iwahara C, Nakayama H, Daida H. Different responses to oxidized low-density lipoproteins in human polarized macrophages. *Lipids Health Dis* 2011; **10**: 1.
- 90 Hughes JE, Srinivasan S, Lynch KR, Proia RL, Ferdek P, Hedrick CC. Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circ Res* 2008; **102**: 950–8.
- 91 Kadl A, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, Elliott MR, Gruber F, Han J, Chen W, Kensler T, Ravichandran KS, Isakson BE, Wamhoff BR, Leitinger N. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* 2010; **107**: 737–46.
- 92 Boyle JJ, Johns M, Kampfer T, Nguyen AT, Game L, Schaer DJ, Mason JC, Haskard DO. Activating transcription factor 1 directs Mhem atheroprotective macrophages through coordinated iron handling and foam cell protection. *Circ Res* 2012; **110**: 20–33.
- 93 Boyle JJ. Heme and haemoglobin direct macrophage Mhem phenotype and counter foam cell formation in areas of intraplaque haemorrhage. *Curr Opin Lipidol* 2012; **23**: 453–61.
- 94 Huang W-C, Sala-Newby GB, Susana A, Johnson JL, Newby AC. Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor- κ B. *PLoS One* 2012; **7**: e42507.
- 95 Newby AC, George SJ, Ismail Y, Johnson JL, Sala-Newby GB, Thomas AC. Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foam cell phenotypes. *Thromb Haemost* 2009; **101**: 1006–11.
- 96 Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010; **32**: 593–604.
- 97 Sayin VI, Khan OM, Pehlivanoglu LE, Staffas A, Ibrahim MX, Asplund A, Agren P, Nilton A, Bergström G, Bergo MO, Borén J, Lindahl P. Loss of one copy of Zfp148 reduces lesional macrophage proliferation and atherosclerosis in mice by activating p53. *Circ Res* 2014; **115**: 781–9.
- 98 Tang J, Lobatto ME, Hassing L, van der Staay S, van Rijs SM, Calcagno C, Braza MS, Baxter S, Fay F, Sanchez-Gaytan BL, Duivenvoorden R, Sager H, Astudillo YM, Leong W, Ramachandran S, Storm G, Pérez-Medina C, Reiner T, Cormode DP, Strijkers GJ, et al. Inhibiting macrophage proliferation suppresses atherosclerotic plaque inflammation. *Sci Adv* 2015; **1**.
- 99 Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 333–7.

- 100 Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 2002; **277**: 49982–8.
- 101 Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* 2009; **119**: 136–45.
- 102 Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; **182**: 1545–56.
- 103 Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 231–41.
- 104 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; **35**: 495–516.
- 105 Tabas I. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ* 2004; **11 Suppl 1**: S12-16.
- 106 Subramanian M, Thorp E, Tabas I. Identification of a non-growth factor role for GM-CSF in advanced atherosclerosis: promotion of macrophage apoptosis and plaque necrosis through IL-23 signaling. *Circ Res* 2015; **116**: e13-24.
- 107 Han S, Liang C-P, DeVries-Seimon T, Ranalletta M, Welch CL, Collins-Fletcher K, Accili D, Tabas I, Tall AR. Macrophage insulin receptor deficiency increases ER stress-induced apoptosis and necrotic core formation in advanced atherosclerotic lesions. *Cell Metab* 2006; **3**: 257–66.
- 108 Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J Biol Chem* 1980; **255**: 9344–52.
- 109 Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 781–92.
- 110 Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, Li G, Malagelada C, Backs J, Backs T, Bassel-Duby R, Olson EN, Anderson ME, Tabas I. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest* 2009; **119**: 2925–41.
- 111 Kavurma MM, Rayner KJ, Karunakaran D. The Walking Dead: Macrophage inflammation and death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2017; **28**: 91–8.
- 112 Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Baehrecke EH, Bazan NG, Bertrand MJ, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Campanella M, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* 2015; **22**: 58–73.
- 113 Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu MN, Ndlovu 'Matladi, Haegeman G, D'Herde K, Vandenabeele P. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 1089–100.

- 114 Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol* 1991; **11**: 1223–30.
- 115 Ovchinnikova OA, Folkersen L, Persson J, Lindeman JHN, Ueland T, Aukrust P, Gavrishcheva N, Shlyakhto E, Paulsson-Berne G, Hedin U, Olofsson PS, Hansson GK. The collagen cross-linking enzyme lysyl oxidase is associated with the healing of human atherosclerotic lesions. *J Intern Med* 2014; **276**: 525–36.
- 116 Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med* 1989; **170**: 1595–608.
- 117 Ovchinnikova O, Robertson A-KL, Wågsäter D, Folco EJ, Hyry M, Myllyharju J, Eriksson P, Libby P, Hansson GK. T-cell activation leads to reduced collagen maturation in atherosclerotic plaques of Apoe(-/-) mice. *Am J Pathol* 2009; **174**: 693–700.
- 118 Bäck M, Ketelhuth DFJ, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog Cardiovasc Dis* 2010; **52**: 410–28.
- 119 Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation* 1995; **92**: 1084–8.
- 120 Zhang G, Li W, Guo Y, Li D, Liu Y, Xu S. MMP Gene Polymorphisms, MMP-1 -1607 1G/2G, -519 A/G, and MMP-12 -82 A/G, and Ischemic Stroke: A Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc* 2018; **27**: 140–52.
- 121 Kowara M, Cudnoch-Jedrzejska A, Opolski G, Wlodarski P. MicroRNA regulation of extracellular matrix components in the process of atherosclerotic plaque destabilization. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2017; **44**: 711–8.
- 122 Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan Z. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002; **105**: 1158–61.
- 123 Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 1561–8.
- 124 West XZ, Malinin NL, Merkulova AA, Tischenko M, Kerr BA, Borden EC, Podrez EA, Salomon RG, Byzova TV. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature* 2010; **467**: 972–6.
- 125 Björkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, Means T, Halmen K, Luster AD, Golenbock DT, Freeman MW. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 2004; **10**: 416–21.
- 126 Rajamäki K, Lappalainen J, Oörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, Eklund KK. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 2010; **5**: e11765.
- 127 Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* 2013; **210**: 1283–99.

- 128 Soehnlein O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res* 2012; **110**: 875–88.
- 129 Drechsler M, Döring Y, Megens RTA, Soehnlein O. Neutrophilic granulocytes - promiscuous accelerators of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2011; **106**: 839–48.
- 130 Della Bona R, Cardillo MT, Leo M, Biasillo G, Gustapane M, Trotta F, Biasucci LM. Polymorphonuclear neutrophils and instability of the atherosclerotic plaque: a causative role? *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc AI* 2013; **62**: 537–50.
- 131 Chen J, Chen M-H, Li S, Guo Y-L, Zhu C-G, Xu R-X, Zhang Y, Sun J, Qing P, Liu G, Li J-J. Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting the severity of coronary artery disease: a Gensini score assessment. *J Atheroscler Thromb* 2014; **21**: 1271–82.
- 132 Ionita MG, van den Borne P, Catanzariti LM, Moll FL, de Vries J-PPM, Pasterkamp G, Vink A, de Kleijn DPV. High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; **30**: 1842–8.
- 133 Moreno JA, Ortega-Gómez A, Delbosc S, Beaufort N, Sorbets E, Louedec L, Esposito-Farèse M, Tubach F, Nicoletti A, Steg PG, Michel J-B, Feldman L, Meilhac O. In vitro and in vivo evidence for the role of elastase shedding of CD163 in human atherothrombosis. *Eur Heart J* 2012; **33**: 252–63.
- 134 Drechsler M, Megens RTA, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* 2010; **122**: 1837–45.
- 135 Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**: 159–75.
- 136 Hemdahl A-L, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, Thorén P, Hansson GK. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**: 136–42.
- 137 Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* 2007; **110**: 1748–55.
- 138 Quinn KL, Henriques M, Tabuchi A, Han B, Yang H, Cheng W-E, Tole S, Yu H, Luo A, Charbonney E, Tullis E, Lazarus A, Robinson LA, Ni H, Peterson BR, Kuebler WM, Slutsky AS, Zhang H. Human neutrophil peptides mediate endothelial-monocyte interaction, foam cell formation, and platelet activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; **31**: 2070–9.
- 139 Soehnlein O, Xie X, Ulbrich H, Kenne E, Rotzius P, Flodgaard H, Eriksson EE, Lindbom L. Neutrophil-derived heparin-binding protein (HBP/CAP37) deposited on endothelium enhances monocyte arrest under flow conditions. *J Immunol Baltim Md 1950* 2005; **174**: 6399–405.
- 140 Taekema-Roelvink ME, Kooten C, Kooij SV, Heemskerk E, Daha MR. Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1. *J Am Soc Nephrol JASN* 2001; **12**: 932–40.
- 141 Ferrante G, Nakano M, Prati F, Niccoli G, Mallus MT, Ramazzotti V, Montone RA, Kolodgie FD, Virmani R, Crea F. High levels of systemic myeloperoxidase are associated with coronary plaque erosion in patients with acute coronary syndromes: a clinicopathological study. *Circulation* 2010; **122**: 2505–13.

- 142 Bobryshev YV, Lord RS. Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions. *Cardiovasc Res* 1998; **37**: 799–810.
- 143 Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 1372–6.
- 144 Bui MN, Sack MN, Moutsatsos G, Lu DY, Katz P, McCown R, Breall JA, Rackley CE. Autoantibody titers to oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 1996; **131**: 663–7.
- 145 Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989; **135**: 169–75.
- 146 Zhou X, Stemme S, Hansson GK. Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol* 1996; **149**: 359–66.
- 147 Elhage R, Gourdy P, Bouchet L, Jawien J, Fouque M-J, Fiévet C, Huc X, Barreira Y, Couloumiers JC, Arnal J-F, Bayard F. Deleting TCR alpha beta+ or CD4+ T lymphocytes leads to opposite effects on site-specific atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 2004; **165**: 2013–8.
- 148 Emeson EE, Shen ML, Bell CG, Qureshi A. Inhibition of atherosclerosis in CD4 T-cell-ablated and nude (nu/nu) C57BL/6 hyperlipidemic mice. *Am J Pathol* 1996; **149**: 675–85.
- 149 Hermansson A, Ketelhuth DFJ, Strodthoff D, Wurm M, Hansson EM, Nicoletti A, Paulsson-Berne G, Hansson GK. Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. *J Exp Med* 2010; **207**: 1081–93.
- 150 Uyemura K, Demer LL, Castle SC, Jullien D, Berliner JA, Gately MK, Warrier RR, Pham N, Fogelman AM, Modlin RL. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1996; **97**: 2130–8.
- 151 Perisic L, Aldi S, Sun Y, Folkersen L, Razuvaev A, Roy J, Lengquist M, Åkesson S, Wheelock CE, Maegdefessel L, Gabrielsen A, Odeberg J, Hansson GK, Paulsson-Berne G, Hedin U. Gene expression signatures, pathways and networks in carotid atherosclerosis. *J Intern Med* 2016; **279**: 293–308.
- 152 Binder CJ, Hartvigsen K, Chang M-K, Miller M, Broide D, Palinski W, Curtiss LK, Corr M, Witztum JL. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest* 2004; **114**: 427–37.
- 153 Zhou X, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1717–25.
- 154 Eid RE, Rao DA, Zhou J, Lo SL, Ranjbaran H, Gallo A, Sokol SI, Pfau S, Pober JS, Tellides G. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2009; **119**: 1424–32.
- 155 Gisterå A, Robertson A-KL, Andersson J, Ketelhuth DFJ, Ovchinnikova O, Nilsson SK, Lundberg AM, Li MO, Flavell RA, Hansson GK. Transforming growth factor- β signaling in T cells promotes stabilization of atherosclerotic plaques through an interleukin-17-dependent pathway. *Sci Transl Med* 2013; **5**: 196ra100.

- 156 de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, van der Wal AC. Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions. *PLoS One* 2007; **2**: e779.
- 157 Kita T, Yamashita T, Sasaki N, Kasahara K, Sasaki Y, Yodoi K, Takeda M, Nakajima K, Hirata K. Regression of atherosclerosis with anti-CD3 antibody via augmenting a regulatory T-cell response in mice. *Cardiovasc Res* 2014; **102**: 107–17.
- 158 Zhou X, Hansson GK. Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice. *Scand J Immunol* 1999; **50**: 25–30.
- 159 Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol* 2017; **13**: 368–80.
- 160 Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; **89**: 2462–78.
- 161 Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 1177–8.
- 162 Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ* 2013; **22**: 399–411.
- 163 Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 2003; **108**: 1664–72.
- 164 Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 1996; **93**: 1354–63.
- 165 Virmani R, Burke AP, Farb A. Sudden cardiac death. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol* 2001; **10**: 275–82.
- 166 Fowkes FGR, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, Norman PE, Sampson UKA, Williams LJ, Mensah GA, Criqui MH. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 2013; **382**: 1329–40.
- 167 Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, Nakamura Y, Yamashita H, Yamagishi H, Takeuchi K, Naruko T, Haze K, Becker AE, Yoshikawa J, Ueda M. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 2004; **110**: 3424–9.
- 168 Schillinger M, Sabeti S, Dick P, Amighi J, Mlekusch W, Schlager O, Loewe C, Cejna M, Lammer J, Minar E. Sustained benefit at 2 years of primary femoropopliteal stenting compared with balloon angioplasty with optional stenting. *Circulation* 2007; **115**: 2745–9.
- 169 Lal BK, Hobson RW, Goldstein J, Geohagan M, Chakhtoura E, Pappas PJ, Jamil Z, Haser PB, Varma S, Padberg FT, Cerveira JJ. In-stent recurrent stenosis after carotid artery stenting: life table analysis and clinical relevance. *J Vasc Surg* 2003; **38**: 1162–8; discussion 1169.

- 170 Babapulle MN, Eisenberg MJ. Coated stents for the prevention of restenosis: Part II. *Circulation* 2002; **106**: 2859–66.
- 171 Haider SN, Kavanagh EG, Forlee M, Colgan MP, Madhavan P, Moore DJ, Shanik GD. Two-year outcome with preferential use of infrainguinal angioplasty for critical ischemia. *J Vasc Surg* 2006; **43**: 504–12.
- 172 Nicoll R, Henein MY. Arterial calcification: friend or foe? *Int J Cardiol* 2013; **167**: 322–7.
- 173 Boström K, Watson KE, Stanford WP, Demer LL. Atherosclerotic calcification: relation to developmental osteogenesis. *Am J Cardiol* 1995; **75**: 88B–91B.
- 174 Drüeke TB. Arterial intima and media calcification: distinct entities with different pathogenesis or all the same? *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 2008; **3**: 1583–4.
- 175 Holmgren A, Rumsby G, Gustafsson S, Näslund U, Henein MY. The nature of cardiac calcification in aortic stenosis. *Int J Cardiol* 2012; **158**: 319–21.
- 176 Verberckmoes SC, Persy V, Behets GJ, Neven E, Hufkens A, Zebger-Gong H, Müller D, Haffner D, Querfeld U, Bohic S, De Broe ME, D’Haese PC. Uremia-related vascular calcification: more than apatite deposition. *Kidney Int* 2007; **71**: 298–303.
- 177 Schlieper G, Aretz A, Verberckmoes SC, Krüger T, Behets GJ, Ghadimi R, Weirich TE, Rohrmann D, Langer S, Tordoir JH, Amann K, Westenfeld R, Brandenburg VM, D’Haese PC, Mayer J, Ketteler M, McKee MD, Floege J. Ultrastructural analysis of vascular calcifications in uremia. *J Am Soc Nephrol JASN* 2010; **21**: 689–96.
- 178 Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, Metabolic, and Genetic Mechanisms of Vascular Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; **34**: 715–23.
- 179 Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke J Cereb Circ* 2002; **33**: 1214–9.
- 180 Amann K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 2008; **3**: 1599–605.
- 181 Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 2006; **99**: 1044–59.
- 182 Pohle K, Mäffert R, Ropers D, Moshage W, Stilianakis N, Daniel WG, Achenbach S. Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation* 2001; **104**: 1927–32.
- 183 Schmermund A, Baumgart D, Möhlenkamp S, Kriener P, Pump H, Grönemeyer D, Seibel R, Erbel R. Natural history and topographic pattern of progression of coronary calcification in symptomatic patients: An electron-beam CT study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 421–6.
- 184 Bild DE, Folsom AR, Lowe LP, Sidney S, Kiefe C, Westfall AO, Zheng ZJ, Rumberger J. Prevalence and correlates of coronary calcification in black and white young adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 852–7.

- 185 Son B-K, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Kojima T, Ota H, Senda Y, Maemura K, Nakano T, Akishita M, Ouchi Y. Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway. *Circ Res* 2006; **98**: 1024–31.
- 186 Callister TQ, Raggi P, Cooil B, Lippolis NJ, Russo DJ. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on coronary artery disease as assessed by electron-beam computed tomography. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1972–8.
- 187 Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, Barros IM, Azevedo LF, Rocha-Gonçalves F, Rajamannan NM. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2007; **49**: 554–61.
- 188 Schmermund A, Achenbach S, Budde T, Buziashvili Y, Förster A, Friedrich G, Henein M, Kerkhoff G, Knollmann F, Kukharchuk V, Lahiri A, Leischik R, Moshage W, Scharl M, Siffert W, Steinhagen-Thiessen E, Sinitsyn V, Vogt A, Wiedeking B, Erbel R. Effect of intensive versus standard lipid-lowering treatment with atorvastatin on the progression of calcified coronary atherosclerosis over 12 months: a multicenter, randomized, double-blind trial. *Circulation* 2006; **113**: 427–37.
- 189 Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, Boon NA, Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression (SALTIRE) Investigators. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med* 2005; **352**: 2389–97.
- 190 Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**: 680–7.
- 191 Proudfoot D, Davies JD, Skepper JN, Weissberg PL, Shanahan CM. Acetylated low-density lipoprotein stimulates human vascular smooth muscle cell calcification by promoting osteoblastic differentiation and inhibiting phagocytosis. *Circulation* 2002; **106**: 3044–50.
- 192 Tintut Y, Parhami F, Boström K, Jackson SM, Demer LL. cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells. Potential signaling pathway for vascular calcification. *J Biol Chem* 1998; **273**: 7547–53.
- 193 Tintut Y, Patel J, Territo M, Saini T, Parhami F, Demer LL. Monocyte/macrophage regulation of vascular calcification in vitro. *Circulation* 2002; **105**: 650–5.
- 194 Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2002; **62**: 1724–31.
- 195 Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor- α promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 2000; **102**: 2636–42.
- 196 Shao J-S, Cheng S-L, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1210–20.
- 197 Kirton JP, Crofts NJ, George SJ, Brennan K, Canfield AE. Wnt/ β -catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease? *Circ Res* 2007; **101**: 581–9.

- 198 Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 2001; **31**: 509–19.
- 199 Abedin M, Lim J, Tang TB, Park D, Demer LL, Tintut Y. N-3 fatty acids inhibit vascular calcification via the p38-mitogen-activated protein kinase and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathways. *Circ Res* 2006; **98**: 727–9.
- 200 Parhami F, Basseri B, Hwang J, Tintut Y, Demer LL. High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells. *Circ Res* 2002; **91**: 570–6.
- 201 Reaven PD, Sacks J, Investigators for the VADT. Coronary artery and abdominal aortic calcification are associated with cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005; **48**: 379–85.
- 202 Okuno S, Ishimura E, Kitatani K, Fujino Y, Kohno K, Maeno Y, Maekawa K, Yamakawa T, Imanishi Y, Inaba M, Nishizawa Y. Presence of abdominal aortic calcification is significantly associated with all-cause and cardiovascular mortality in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2007; **49**: 417–25.
- 203 Nelson RG, Gohdes DM, Everhart JE, Hartner JA, Zwemer FL, Pettitt DJ, Knowler WC. Lower-extremity amputations in NIDDM. 12-yr follow-up study in Pima Indians. *Diabetes Care* 1988; **11**: 8–16.
- 204 Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Rönkämaa T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; **16**: 978–83.
- 205 London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2003; **18**: 1731–40.
- 206 El-Abbadi M, Giachelli CM. Mechanisms of vascular calcification. *Adv Chronic Kidney Dis* 2007; **14**: 54–66.
- 207 Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000; **87**: E10–17.
- 208 Li X, Yang H-Y, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2008; **199**: 271–7.
- 209 Li X, Yang H-Y, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2006; **98**: 905–12.
- 210 Towler DA. Angiogenesis and marrow stromal cell fates: roles in bone strength. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 2003; **14 Suppl 5**: S46–50; discussion S50–53.
- 211 Heinonen SE, Leppänen P, Kholová I, Lumivuori H, Häkkinen S-K, Bosch F, Laakso M, Ylä-Herttuala S. Increased atherosclerotic lesion calcification in a novel mouse model combining insulin resistance, hyperglycemia, and hypercholesterolemia. *Circ Res* 2007; **101**: 1058–67.
- 212 Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 1400–7.

- 213 Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res* 2005; **66**: 307–17.
- 214 Essalihi R, Dao HH, Gilbert L-A, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD, Moreau P. Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation* 2005; **112**: 1628–35.
- 215 Bailey M, Pillarisetti S, Jones P, Xiao H, Simionescu D, Vyavahare N. Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol* 2004; **13**: 146–55.
- 216 Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol JASN* 2004; **15**: 1392–401.
- 217 O'Neill WC. Vascular calcification: not so crystal clear. *Kidney Int* 2007; **71**: 282–3.
- 218 Lee JS, Basalyga DM, Simionescu A, Isenburg JC, Simionescu DT, Vyavahare NR. Elastin calcification in the rat subdermal model is accompanied by up-regulation of degradative and osteogenic cellular responses. *Am J Pathol* 2006; **168**: 490–8.
- 219 Qin X, Corriere MA, Matrisian LM, Guzman RJ. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**: 1510–6.
- 220 Cheng Z, Limbu MH, Wang Z, Liu J, Liu L, Zhang X, Chen P, Liu B. MMP-2 and 9 in Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci* 2017; **18**.
- 221 Thompson B, Towler DA. Arterial calcification and bone physiology: role of the bone-vascular axis. *Nat Rev Endocrinol* 2012; **8**: 529–43.
- 222 Rogers NM, Coates PTH. Calcific uraemic arteriolopathy: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; **17**: 629–34.
- 223 Moe SM, Chen NX. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol JASN* 2008; **19**: 213–6.
- 224 Sowers KM, Hayden MR. Calcific uremic arteriolopathy: pathophysiology, reactive oxygen species and therapeutic approaches. *Oxid Med Cell Longev* 2010; **3**: 109–21.
- 225 Griethe W, Schmitt R, Jurgensen JS, Bachmann S, Eckardt K-U, Schindler R. Bone morphogenic protein-4 expression in vascular lesions of calciphylaxis. *J Nephrol* 2003; **16**: 728–32.
- 226 Feng JQ, Xing L, Zhang J-H, Zhao M, Horn D, Chan J, Boyce BF, Harris SE, Mundy GR, Chen D. NF-kappaB specifically activates BMP-2 gene expression in growth plate chondrocytes in vivo and in a chondrocyte cell line in vitro. *J Biol Chem* 2003; **278**: 29130–5.
- 227 Nigwekar SU, Wolf M, Sterns RH, Hix JK. Calciphylaxis from nonuremic causes: a systematic review. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 2008; **3**: 1139–43.
- 228 Weenig RH, Sewell LD, Davis MDP, McCarthy JT, Pittelkow MR. Calciphylaxis: natural history, risk factor analysis, and outcome. *J Am Acad Dermatol* 2007; **56**: 569–79.
- 229 Saghaizadeh A, Hafizi S, Rezaei N. Inflammation in venous thromboembolism: Cause or consequence? *Int Immunopharmacol* 2015; **28**: 655–65.

- 230 Nigwekar SU, Thadhani R, Brandenburg VM. Calciphylaxis. *N Engl J Med* 2018; **378**: 1704–14.
- 231 Chen J-H, Simmons CA. Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues. *Circ Res* 2011; **108**: 1510–24.
- 232 Farrar EJ, Huntley GD, Butcher J. Correction: Endothelial-derived oxidative stress drives myofibroblastic activation and calcification of the aortic valve. *PLoS One* 2015; **10**: e0128850.
- 233 Anstine LJ, Bobba C, Ghadiali S, Lincoln J. Growth and maturation of heart valves leads to changes in endothelial cell distribution, impaired function, decreased metabolism and reduced cell proliferation. *J Mol Cell Cardiol* 2016; **100**: 72–82.
- 234 Rajamannan NM. Mechanisms of aortic valve calcification: the LDL-density-radius theory: a translation from cell signaling to physiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; **298**: H5-15.
- 235 Towler DA. Oxidation, inflammation, and aortic valve calcification peroxide paves an osteogenic path. *J Am Coll Cardiol* 2008; **52**: 851–4.
- 236 Lee SH, Choi J-H. Involvement of Immune Cell Network in Aortic Valve Stenosis: Communication between Valvular Interstitial Cells and Immune Cells. *Immune Netw* 2016; **16**: 26–32.
- 237 Weinstein G, Maillard P, Himali JJ, Beiser AS, Au R, Wolf PA, Seshadri S, DeCarli C. Glucose indices are associated with cognitive and structural brain measures in young adults. *Neurology* 2015; **84**: 2329–37.
- 238 Hruska KA, Seifert M, Sugatani T. Pathophysiology of the chronic kidney disease-mineral bone disorder. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2015; **24**: 303–9.
- 239 Juutilainen A, Lehto S, Suhonen M, Rönnemaa T, Laakso M. Thoracoabdominal calcifications predict cardiovascular disease mortality in type 2 diabetic and nondiabetic subjects: 18-year follow-up study. *Diabetes Care* 2010; **33**: 583–5.
- 240 Maillard P, Mitchell GF, Himali JJ, Beiser A, Tsao CW, Pase MP, Satizabal CL, Vasani RS, Seshadri S, DeCarli C. Effects of Arterial Stiffness on Brain Integrity in Young Adults From the Framingham Heart Study. *Stroke* 2016; **47**: 1030–6.
- 241 Pase MP, Himali JJ, Mitchell GF, Beiser A, Maillard P, Tsao C, Larson MG, DeCarli C, Vasani RS, Seshadri S. Association of Aortic Stiffness With Cognition and Brain Aging in Young and Middle-Aged Adults: The Framingham Third Generation Cohort Study. *Hypertens Dallas Tex 1979* 2016; **67**: 513–9.
- 242 Allison MA, Criqui MH, Wright CM. Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 331–6.
- 243 Thomas IC, Thompson CA, Yang M, Allison MA, Forbang NI, Michos ED, McClelland RL, Budoff MJ, Criqui MH. Thoracic Aorta Calcification and Noncardiovascular Disease-Related Mortality: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; .
- 244 Hayden MR, Tyagi SC, Kolb L, Sowers JR, Khanna R. Vascular ossification-calcification in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, chronic kidney disease, and calciphylaxis-calcific uremic arteriopathy: the emerging role of sodium thiosulfate. *Cardiovasc Diabetol* 2005; **4**: 4.
- 245 Rifkin DE, Ix JH, Wassel CL, Criqui MH, Allison MA. Renal artery calcification and mortality among clinically asymptomatic adults. *J Am Coll Cardiol* 2012; **60**: 1079–85.

- 246 Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, Hiratzka LF, Murphy WRC, Olin JW, Puschett JB, Rosenfield KA, Sacks D, Stanley JC, Taylor LM, White CJ, White J, White RA, Antman EM, Smith SC, Adams CD, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation* 2006; **113**: e463-654.
- 247 Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, Bild DE, Burke G, Folsom AR, Liu K, Shea S, Szklo M, Bluemke DA, O'Leary DH, Tracy R, Watson K, Wong ND, Kronmal RA. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med* 2008; **358**: 1336–45.
- 248 Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990; **15**: 827–32.
- 249 Budoff MJ, Hokanson JE, Nasir K, Shaw LJ, Kinney GL, Chow D, Demoss D, Nuguri V, Nabavi V, Ratakonda R, Berman DS, Raggi P. Progression of coronary artery calcium predicts all-cause mortality. *JACC Cardiovasc Imaging* 2010; **3**: 1229–36.
- 250 Bakhshi H, Ambale-Venkatesh B, Yang X, Ostovaneh MR, Wu CO, Budoff M, Bahrami H, Wong ND, Bluemke DA, Lima JAC. Progression of Coronary Artery Calcium and Incident Heart Failure: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2017; **6**.
- 251 Nitta K, Ogawa T. Vascular calcification in end-stage renal disease patients. *Contrib Nephrol* 2015; **185**: 156–67.
- 252 Floege J, Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2004; **19 Suppl 5**: V59-66.
- 253 Stompór T. Coronary artery calcification in chronic kidney disease: An update. *World J Cardiol* 2014; **6**: 115–29.
- 254 Herisson F, Heymann M-F, Chétiveaux M, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, Rouillon T, Krempf M, Lemarchand P, Heymann D, Gouëffic Y. Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis* 2011; .
- 255 Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, Schurgers LJ, Skepper JN, Proudfoot D, Mayr M, Shanahan CM. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res* 2011; **109**: e1-12.
- 256 Shroff R, Long DA, Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol JASN* 2013; **24**: 179–89.
- 257 Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol JASN* 2004; **15**: 2857–67.

- 258 Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Moe SM. Annexin-mediated matrix vesicle calcification in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2008; **23**: 1798–805.
- 259 Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The role of osteoprotegerin in the crosstalk between vessels and bone: Its potential utility as a marker of cardiometabolic diseases. *Pharmacol Ther* 2018; **182**: 115–32.
- 260 Fuery MA, Liang L, Kaplan FS, Mohler ER. Vascular ossification: Pathology, mechanisms, and clinical implications. *Bone* 2018; **109**: 28–34.
- 261 Majesky MW. Vascular Development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; **38**: e17–24.
- 262 Dart AM, Kingwell BA. Pulse pressure--a review of mechanisms and clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 2001; **37**: 975–84.
- 263 Ponticos M, Smith BD. Extracellular matrix synthesis in vascular disease: hypertension, and atherosclerosis. *J Biomed Res* 2014; **28**: 25–39.
- 264 Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 1248–58.
- 265 Sinha S, Iyer D, Granata A. Embryonic origins of human vascular smooth muscle cells: implications for in vitro modeling and clinical application. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2014; **71**: 2271–88.
- 266 Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res* 2011; **109**: 697–711.
- 267 Marra KG, Brayfield CA, Rubin JP. Adipose stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2011; **702**: 261–8.
- 268 Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res* 2018; **114**: 590–600.
- 269 Otsuka F, Sakakura K, Yahagi K, Joner M, Virmani R. Has our understanding of calcification in human coronary atherosclerosis progressed? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; **34**: 724–36.
- 270 Hutcheson JD, Goettsch C, Bertazzo S, Maldonado N, Ruiz JL, Goh W, Yabusaki K, Faits T, Bouten C, Franck G, Quillard T, Libby P, Aikawa M, Weinbaum S, Aikawa E. Genesis and growth of extracellular-vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques. *Nat Mater* 2016; **15**: 335–43.
- 271 Cheng S-L, Ramachandran B, Behrmann A, Shao J-S, Mead M, Smith C, Krcma K, Bello Arredondo Y, Kovacs A, Kapoor K, Brill LM, Perera R, Williams BO, Towler DA. Vascular smooth muscle LRP6 limits arteriosclerotic calcification in diabetic LDLR^{-/-} mice by restraining noncanonical Wnt signals. *Circ Res* 2015; **117**: 142–56.
- 272 Bobryshev YV. Transdifferentiation of smooth muscle cells into chondrocytes in atherosclerotic arteries in situ: implications for diffuse intimal calcification. *J Pathol* 2005; **205**: 641–50.
- 273 Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, Kirk EA, Ricks JL, Speer M, Schwartz SM, Giachelli CM, Rosenfeld ME. Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 1420–5.

- 274 Naik V, Leaf EM, Hu JH, Yang H-Y, Nguyen NB, Giachelli CM, Speer MY. Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an in vivo genetic fate mapping study. *Cardiovasc Res* 2012; **94**: 545–54.
- 275 Nguyen N, Naik V, Speer MY. Diabetes mellitus accelerates cartilaginous metaplasia and calcification in atherosclerotic vessels of LDLr mutant mice. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol* 2013; **22**: 167–75.
- 276 Hungerford JE, Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res* 1999; **36**: 2–27.
- 277 Le Lièvre CS, Le Douarin NM. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1975; **34**: 125–54.
- 278 Schor AM, Canfield AE, Sutton AB, Arciniegas E, Allen TD. Pericyte differentiation. *Clin Orthop* 1995; : 81–91.
- 279 Sims DE. The pericyte--a review. *Tissue Cell* 1986; **18**: 153–74.
- 280 Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, Orekhov AN. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue Cell* 1998; **30**: 127–35.
- 281 Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol* 2010; **7**: 528–36.
- 282 Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 1998; **13**: 828–38.
- 283 Collett GDM, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res* 2005; **96**: 930–8.
- 284 Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, Tawonsawatruk T, Lazzari L, Soo C, Péault B. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2014; **71**: 1353–74.
- 285 Zebboudj AF, Shin V, Boström K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem* 2003; **90**: 756–65.
- 286 Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal CCS* 2011; **9**: 12.
- 287 Lin M-E, Chen TM, Wallingford MC, Nguyen NB, Yamada S, Sawangmake C, Zhang J, Speer MY, Giachelli CM. Runx2 Deletion in Smooth muscle Cells Inhibits Vascular Osteochondrogenesis and Calcification but not Atherosclerotic Lesion Formation. *Cardiovasc Res* 2016; .
- 288 Tchetina E, Mwale F, Poole AR. Distinct phases of coordinated early and late gene expression in growth plate chondrocytes in relationship to cell proliferation, matrix assembly, remodeling, and cell differentiation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2003; **18**: 844–51.
- 289 Nahar NN, Missana LR, Garimella R, Tague SE, Anderson HC. Matrix vesicles are carriers of bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), and noncollagenous matrix proteins. *J Bone Miner Metab* 2008; **26**: 514–9.

- 290 Trombetti A, Stoermann C, Chevalley T, Van Rietbergen B, Herrmann FR, Martin P-Y, Rizzoli R. Alterations of bone microstructure and strength in end-stage renal failure. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 2013; **24**: 1721–32.
- 291 Dautova Y, Kozlova D, Skepper JN, Epple M, Bootman MD, Proudfoot D. Fetuin-A and albumin alter cytotoxic effects of calcium phosphate nanoparticles on human vascular smooth muscle cells. *PLoS One* 2014; **9**: e97565.
- 292 Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, Jahnen-Dechent W, Shanahan CM. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol JASN* 2005; **16**: 2920–30.
- 293 Denecke B, Gräber S, Schäfer C, Heiss A, Wöltje M, Jahnen-Dechent W. Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *Biochem J* 2003; **376**: 135–45.
- 294 Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; **386**: 78–81.
- 295 Cranenburg ECM, Vermeer C, Koos R, Boumans M-L, Hackeng TM, Bouwman FG, Kwaijtaal M, Brandenburg VM, Ketteler M, Schurgers LJ. The circulating inactive form of matrix Gla Protein (ucMGP) as a biomarker for cardiovascular calcification. *J Vasc Res* 2008; **45**: 427–36.
- 296 Schurgers LJ. Vitamin K: key vitamin in controlling vascular calcification in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2013; **83**: 782–4.
- 297 Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int* 2008; **73**: 1024–30.
- 298 Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, Hiorns M, Donald AE, Deanfield J, Rees L, Shanahan CM. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation* 2008; **118**: 1748–57.
- 299 Lomashvili KA, Khawandi W, O'Neill WC. Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol JASN* 2005; **16**: 2495–500.
- 300 O'Neill WC, Sigrist MK, McIntyre CW. Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2010; **25**: 187–91.
- 301 Lomashvili KA, Narisawa S, Millán JL, O'Neill WC. Vascular calcification is dependent on plasma levels of pyrophosphate. *Kidney Int* 2014; **85**: 1351–6.
- 302 Hasegawa T. Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization. *Histochem Cell Biol* 2018; **149**: 289–304.
- 303 Zebboudj AF, Imura M, Boström K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002; **277**: 4388–94.
- 304 Mathew S, Davies M, Lund R, Saab G, Hruska KA. Function and effect of bone morphogenetic protein-7 in kidney bone and the bone-vascular links in chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest* 2006; **36 Suppl 2**: 43–50.

- 305 Tang SY, Alliston T. Regulation of postnatal bone homeostasis by TGF β . *BoneKEy Rep* 2013; **2**.
- 306 Pfeilschifter J, Wolf O, Naumann A, Minne HW, Mundy GR, Ziegler R. Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 1990; **5**: 825–30.
- 307 Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J, Feng X, Van Hul W, Wan M, Cao X. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med* 2009; **15**: 757–65.
- 308 Joyce ME, Terek RM, Jingushi S, Bolander ME. Role of transforming growth factor-beta in fracture repair. *Ann N Y Acad Sci* 1990; **593**: 107–23.
- 309 Lind M, Schumacker B, Søballe K, Keller J, Melsen F, Bünger C. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand* 1993; **64**: 553–6.
- 310 Nielsen HM, Andreassen TT, Ledet T, Oxlund H. Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 1994; **65**: 37–41.
- 311 Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J* 2001; **20**: 2254–72.
- 312 Borton AJ, Frederick JP, Datto MB, Wang XF, Weinstein RS. The loss of Smad3 results in a lower rate of bone formation and osteopenia through dysregulation of osteoblast differentiation and apoptosis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2001; **16**: 1754–64.
- 313 Fox SW, Lovibond AC. Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption. *Mol Cell Endocrinol* 2005; **243**: 19–26.
- 314 Pilkington MF, Sims SM, Dixon SJ. Transforming growth factor-beta induces osteoclast ruffling and chemotaxis: potential role in osteoclast recruitment. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2001; **16**: 1237–47.
- 315 Dieudonné SC, Foo P, van Zoelen EJ, Burger EH. Inhibiting and stimulating effects of TGF-beta 1 on osteoclastic bone resorption in fetal mouse bone organ cultures. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 1991; **6**: 479–87.
- 316 Tashjian AH, Voelkel EF, Lazzaro M, Singer FR, Roberts AB, Derynck R, Winkler ME, Levine L. Alpha and beta human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**: 4535–8.
- 317 Shinar DM, Sato M, Rodan GA. The effect of hemopoietic growth factors on the generation of osteoclast-like cells in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* 1990; **126**: 1728–35.
- 318 Pfeilschifter J, Seyedin SM, Mundy GR. Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J Clin Invest* 1988; **82**: 680–5.
- 319 Kaneda T, Nojima T, Nakagawa M, Ogasawara A, Kaneko H, Sato T, Mano H, Kumegawa M, Hakeda Y. Endogenous production of TGF-beta is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF-kappa B ligand and macrophage-colony-stimulating factor. *J Immunol Baltim Md 1950* 2000; **165**: 4254–63.
- 320 Mohammad KS, Chen CG, Balooch G, Stebbins E, McKenna CR, Davis H, Niewolna M, Peng XH, Nguyen DHN, Ionova-Martin SS, Bracey JW, Hogue WR, Wong DH, Ritchie RO, Suva LJ, Derynck

- R, Guise TA, Alliston T. Pharmacologic inhibition of the TGF-beta type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone. *PloS One* 2009; **4**: e5275.
- 321 Murakami T, Yamamoto M, Ono K, Nishikawa M, Nagata N, Motoyoshi K, Akatsu T. Transforming growth factor-beta1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **252**: 747–52.
 - 322 Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects. *J Biol Chem* 2001; **276**: 36241–50.
 - 323 Subramaniam M, Hawse JR, Bruinsma ES, Grygo SB, Cicek M, Oursler MJ, Spelsberg TC. TGFbeta inducible early gene-1 directly binds to, and represses, the OPG promoter in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **392**: 72–6.
 - 324 Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem* 2002; **277**: 21352–60.
 - 325 Oreffo RO, Mundy GR, Seyedin SM, Bonewald LF. Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **158**: 817–23.
 - 326 Oursler MJ. Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 1994; **9**: 443–52.
 - 327 Parfitt AM. The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2001; **16**: 1583–5.
 - 328 Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, Plesner T, Delaisse J-M. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol* 2009; **174**: 239–47.
 - 329 Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol Baltim Md 1950* 2001; **166**: 7556–62.
 - 330 Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 2003; **200**: 500–3.
 - 331 Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO. TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res* 2003; **282**: 90–100.
 - 332 Malmström J, Lindberg H, Lindberg C, Bratt C, Wieslander E, Delander E-L, Särnstrand B, Burns JS, Mose-Larsen P, Fey S, Marko-Varga G. Transforming growth factor-beta 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus. *Mol Cell Proteomics MCP* 2004; **3**: 466–77.
 - 333 Jeziorska M. Transforming growth factor-betas and CD105 expression in calcification and bone formation in human atherosclerotic lesions. *Z Kardiol* 2001; **90 Suppl 3**: 23–6.
 - 334 Simionescu A, Philips K, Vyavahare N. Elastin-derived peptides and TGF-beta1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **334**: 524–32.

- 335 Wang N, Wang X, Xing C, Sun B, Yu X, Hu J, Liu J, Zeng M, Xiong M, Zhou S, Yang J. Role of TGF-beta1 in bone matrix production in vascular smooth muscle cells induced by a high-phosphate environment. *Nephron Exp Nephrol* 2010; **115**: e60-68.
- 336 Toma I, McCaffrey TA. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res* 2012; **347**: 155–75.
- 337 Jeziorska M, McCollum C, Wooley DE. Observations on bone formation and remodelling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *Virchows Arch Int J Pathol* 1998; **433**: 559–65.
- 338 Demer LL, Watson KE, Boström K. Mechanism of calcification in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 1994; **4**: 45–9.
- 339 Beazley KE, Nurminsky D, Lima F, Gandhi C, Nurminskaya MV. Wnt16 attenuates TGF β -induced chondrogenic transformation in vascular smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; **35**: 573–9.
- 340 Krohn JB, Hutcheson JD, Martínez-Martínez E, Irvin WS, Bouten CVC, Bertazzo S, Bendeck MP, Aikawa E. Discoidin Domain Receptor-1 Regulates Calcific Extracellular Vesicle Release in Vascular Smooth Muscle Cell Fibrocalcific Response via Transforming Growth Factor- β Signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; **36**: 525–33.
- 341 Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol JASN* 2009; **20**: 1453–64.
- 342 Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 2008; **117**: 2938–48.
- 343 Loebel C, Czekanska EM, Bruderer M, Salzmann G, Alini M, Stoddart MJ. In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. *Tissue Eng Part A* 2015; **21**: 115–23.
- 344 Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 2010; **339**: 189–95.
- 345 Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem* 2005; **280**: 41155–64.
- 346 Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2001; **276**: 20659–72.
- 347 Hofbauer LC, Heufelder AE. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 2355–63.
- 348 Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med Berl Ger* 2001; **79**: 243–53.
- 349 Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; **12**: 1260–8.

- 350 Han Y, You X, Xing W, Zhang Z, Zou W. Paracrine and endocrine actions of bone—the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Res* 2018; **6**.
- 351 Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D, Stolina M, Kostenuik PJ, Demer LL. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *Idlr*($-/-$) mice. *Circulation* 2008; **117**: 411–20.
- 352 Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 1610–6.
- 353 Deuell KA, Callegari A, Giachelli CM, Rosenfeld ME, Scatena M. RANKL enhances macrophage paracrine pro-calcific activity in high phosphate-treated smooth muscle cells: dependence on IL-6 and TNF- α . *J Vasc Res* 2012; **49**: 510–21.
- 354 Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Rédini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2007; **64**: 2334–50.
- 355 Baud'huin M, Duplomb L, Téletchéa S, Charrier C, Maillason M, Fouassier M, Heymann D. Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival. *J Biol Chem* 2009; **284**: 31704–13.
- 356 Scatena M, Giachelli C. The $\alpha(v)\beta 3$ integrin, NF-kappaB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; **12**: 83–8.
- 357 Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an $\alpha v\beta 3$ -induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 20959–62.
- 358 Pritzker LB, Scatena M, Giachelli CM. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 2834–41.
- 359 Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998; **273**: 14363–7.
- 360 Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 1566–71.
- 361 Kim Y-M, Kim Y-M, Lee YM, Kim H-S, Kim JD, Choi Y, Kim K-W, Lee S-Y, Kwon Y-G. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 6799–805.
- 362 Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, Seki S, Kasai M, Utsuyama M, Tatsumi M, Uematsu H, Hirokawa K. Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **314**: 1021–7.
- 363 Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001; **142**: 1419–26.

- 364 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; **139**: 1329–37.
- 365 Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; **93**: 165–76.
- 366 Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 25190–4.
- 367 Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 1998; **188**: 997–1001.
- 368 Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; **397**: 315–23.
- 369 Ben-Tal Cohen E, Hohensinner PJ, Kaun C, Maurer G, Huber K, Wojta J. Statins decrease TNF- α -induced osteoprotegerin production by endothelial cells and smooth muscle cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 2007; **73**: 77–83.
- 370 Kim H-H, Shin HS, Kwak HJ, Ahn KY, Kim J-H, Lee HJ, Lee M-S, Lee ZH, Koh GY. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2003; **17**: 2163–5.
- 371 Helas S, Goettsch C, Schoppet M, Zeitz U, Hempel U, Morawietz H, Kostenuik PJ, Erben RG, Hofbauer LC. Inhibition of receptor activator of NF- κ B ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. *Am J Pathol* 2009; **175**: 473–8.
- 372 Venuraju SM, Yerramasu A, Corder R, Lahiri A. Osteoprotegerin as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular mortality and morbidity. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**: 2049–61.
- 373 Speer MY, McKee MD, Guldborg RE, Liaw L, Yang H-Y, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med* 2002; **196**: 1047–55.
- 374 Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* 2005; **96**: 717–22.
- 375 Weckbach LT, Grabmaier U, Clauss S, Wakili R. MicroRNAs as a diagnostic tool for heart failure and atrial fibrillation. *Curr Opin Pharmacol* 2016; **27**: 24–30.
- 376 Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; **9**: 102–14.
- 377 Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 376–85.

- 378 Lewis BP, Shih I -hun., Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; **115**: 787–98.
- 379 Vogiatzi G, Oikonomou E, Deftereos S, Siasos G, Tousoulis D. Peripheral artery disease: a micro-RNA-related condition? *Curr Opin Pharmacol* 2018; **39**: 105–12.
- 380 McDonald RA, Hata A, MacLean MR, Morrell NW, Baker AH. MicroRNA and vascular remodelling in acute vascular injury and pulmonary vascular remodelling. *Cardiovasc Res* 2012; **93**: 594–604.
- 381 Yamakuchi M. MicroRNAs in Vascular Biology. *Int J Vasc Med* 2012; **2012**: 794898.
- 382 Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee T-H, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 2009; **460**: 705–10.
- 383 Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A. Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype. *J Biol Chem* 2009; **284**: 3728–38.
- 384 Wang M, Li W, Chang G-Q, Ye C-S, Ou J-S, Li X-X, Liu Y, Cheang T-Y, Huang X-L, Wang S-M. MicroRNA-21 regulates vascular smooth muscle cell function via targeting tropomyosin 1 in arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; **31**: 2044–53.
- 385 Caporali A, Meloni M, Völlenkle C, Bonci D, Sala-Newby GB, Addis R, Spinetti G, Losa S, Masson R, Baker AH, Agami R, le Sage C, Condorelli G, Madeddu P, Martelli F, Emanuelli C. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation* 2011; **123**: 282–91.
- 386 Li T, Cao H, Zhuang J, Wan J, Guan M, Yu B, Li X, Zhang W. Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2011; **412**: 66–70.
- 387 Stather PW, Sylvis N, Wild JB, Choke E, Sayers RD, Bown MJ. Differential microRNA expression profiles in peripheral arterial disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2013; **6**: 490–7.
- 388 Brennan-Speranza TC, Conigrave AD. Osteocalcin: an osteoblast-derived polypeptide hormone that modulates whole body energy metabolism. *Calcif Tissue Int* 2015; **96**: 1–10.
- 389 Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *J Cell Biochem* 2009; **108**: 216–24.
- 390 Laxman N, Rubin C-J, Mallmin H, Nilsson O, Pastinen T, Grundberg E, Kindmark A. Global miRNA expression and correlation with mRNA levels in primary human bone cells. *RNA N Y N* 2015; **21**: 1433–43.
- 391 van Leeuwen JP, van Driel M, van den Bemd GJ, Pols HA. Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2001; **11**: 199–226.
- 392 Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, Fukuda T, Maruyama M, Okuda A, Amemiya T, Kondoh Y, Tashiro H, Okazaki Y. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **368**: 267–72.

- 393 Yin JJ, Pollock CB, Kelly K. Mechanisms of cancer metastasis to the bone. *Cell Res* 2005; **15**: 57–62.
- 394 Mohri T, Nakajima M, Takagi S, Komagata S, Yokoi T. MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer* 2009; **125**: 1328–33.
- 395 Chen Q, Liu W, Sinha KM, Yasuda H, de Crombrughe B. Identification and characterization of microRNAs controlled by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *PLoS One* 2013; **8**: e58104.
- 396 Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dayt Ohio* 2010; **28**: 357–64.
- 397 Wadhwa S, Choudhary S, Voznesensky M, Epstein M, Raisz L, Pilbeam C. Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **297**: 46–51.
- 398 Forwood MR. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 1996; **11**: 1688–93.
- 399 Greenhough A, Smartt HJM, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; **30**: 377–86.
- 400 Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, Jensen K, Furneaux H, Dey SK. MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 15144–9.
- 401 Okamoto H, Matsumi Y, Hoshikawa Y, Takubo K, Ryoke K, Shiota G. Involvement of microRNAs in regulation of osteoblastic differentiation in mouse induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2012; **7**: e43800.
- 402 Yu S, Geng Q, Pan Q, Liu Z, Ding S, Xiang Q, Sun F, Wang C, Huang Y, Hong A. MiR-690, a Runx2-targeted miRNA, regulates osteogenic differentiation of C2C12 myogenic progenitor cells by targeting NF-kappaB p65. *Cell Biosci* 2016; **6**: 10.
- 403 Guo Y, Wang Y, Liu Y, Liu Y, Zeng Q, Zhao Y, Zhang X, Zhang X. MicroRNA-218, microRNA-191*, microRNA-3070a and microRNA-33 are responsive to mechanical strain exerted on osteoblastic cells. *Mol Med Rep* 2015; **12**: 3033–8.
- 404 Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol* 2000; **11**: 279–303.
- 405 Eguchi T, Watanabe K, Hara ES, Ono M, Kuboki T, Calderwood SK. OsteoMiR: a novel panel of microRNA biomarkers in osteoblastic and osteocytic differentiation from mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2013; **8**: e58796.
- 406 Sun C, Huang F, Liu X, Xiao X, Yang M, Hu G, Liu H, Liao L. miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. *Int J Mol Med* 2015; **35**: 847–53.
- 407 Shevde LA, Metge BJ, Mitra A, Xi Y, Ju J, King JA, Samant RS. Spheroid-forming subpopulation of breast cancer cells demonstrates vasculogenic mimicry via hsa-miR-299-5p regulated de novo expression of osteopontin. *J Cell Mol Med* 2010; **14**: 1693–706.

- 408 Tu M, Li Y, Zeng C, Deng Z, Gao S, Xiao W, Luo W, Jiang W, Li L, Lei G. MicroRNA-127-5p regulates osteopontin expression and osteopontin-mediated proliferation of human chondrocytes. *Sci Rep* 2016; **6**: 25032.
- 409 Byers PH, Shapiro JR, Rowe DW, David KE, Holbrook KA. Abnormal alpha 2-chain in type I collagen from a patient with a form of osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest* 1983; **71**: 689–97.
- 410 Tsipouras P, Myers JC, Ramirez F, Prockop DJ. Restriction fragment length polymorphism associated with the pro alpha 2(I) gene of human type I procollagen. Application to a family with an autosomal dominant form of osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest* 1983; **72**: 1262–7.
- 411 Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **412**: 74–9.
- 412 Kalajzic I, Staal A, Yang W-P, Wu Y, Johnson SE, Feyen JHM, Krueger W, Maye P, Yu F, Zhao Y, Kuo L, Gupta RR, Achenie LEK, Wang H-W, Shin D-G, Rowe DW. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem* 2005; **280**: 24618–26.
- 413 Li C, Nguyen HT, Zhuang Y, Lin Y, Flemington EK, Guo W, Guenther J, Burow ME, Morris GF, Sullivan D, Shan B. Post-transcriptional up-regulation of miR-21 by type I collagen. *Mol Carcinog* 2011; **50**: 563–70.
- 414 Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008; **454**: 56–61.
- 415 Liu F, Lv Q, Du WW, Li H, Yang X, Liu D, Deng Z, Ling W, Zhang Y, Yang BB. Specificity of miR-378a-5p targeting rodent fibronectin. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1833**: 3272–85.
- 416 Lenselink EA. Role of fibronectin in normal wound healing. *Int Wound J* 2015; **12**: 313–6.
- 417 Wang Q, Wang Y, Minto AW, Wang J, Shi Q, Li X, Quigg RJ. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2008; **22**: 4126–35.
- 418 Tang O, Chen X-M, Shen S, Hahn M, Pollock CA. MiRNA-200b represses transforming growth factor- β 1-induced EMT and fibronectin expression in kidney proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; **304**: F1266-1273.
- 419 Haimovici H, Maier N. FATE OF AORTIC HOMOGRAFTS IN CANINE ATHEROSCLEROSIS. 3. STUDY OF FRESH ABDOMINAL AND THORACIC AORTIC IMPLANTS INTO THORACIC AORTA: ROLE OF TISSUE SUSCEPTIBILITY IN ATHEROGENESIS. *Arch Surg Chic Ill* 1960 1964; **89**: 961–9.
- 420 Diehm N, Shang A, Silvestro A, Do D-D, Dick F, Schmidli J, Mahler F, Baumgartner I. Association of cardiovascular risk factors with pattern of lower limb atherosclerosis in 2659 patients undergoing angioplasty. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2006; **31**: 59–63.
- 421 Heymann M-F, Herisson F, Davaine J-M, Charrier C, Battaglia S, Passuti N, Lambert G, Gouëffic Y, Heymann D. Role of the OPG/RANK/RANKL triad in calcifications of the atheromatous plaques: comparison between carotid and femoral beds. *Cytokine* 2012; **58**: 300–6.
- 422 Sulkava M, Raitoharju E, Levula M, Seppälä I, Lyytikäinen L-P, Mennander A, Järvinen O, Zeitlin R, Salenius J-P, Illig T, Klopp N, Mononen N, Laaksonen R, Kähönen M, Oksala N, Lehtimäki T. Differentially expressed genes and canonical pathway expression in human atherosclerotic plaques - Tampere Vascular Study. *Sci Rep* 2017; **7**: 41483.

- 423 Soor GS, Vukin I, Leong SW, Oreopoulos G, Butany J. Peripheral vascular disease: who gets it and why? A histomorphological analysis of 261 arterial segments from 58 cases. *Pathology (Phila)* 2008; **40**: 385–91.
- 424 Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 2001; **103**: 1522–8.
- 425 Dalager S, Paaske WP, Kristensen IB, Laurberg JM, Falk E. Artery-related differences in atherosclerosis expression: implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke* 2007; **38**: 2698–705.
- 426 New SEP, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, Libby P, Shanahan CM, Croce K, Aikawa E. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2013; **113**: 72–7.
- 427 Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000; **87**: 1055–62.
- 428 Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993; **91**: 1800–9.
- 429 Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 379–88.
- 430 Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Boström K, Demer LL. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 2003; **108**: 2505–10.
- 431 Liu T, Lin J, Ju T, Chu L, Zhang L. Vascular smooth muscle cell differentiation to an osteogenic phenotype involves matrix metalloproteinase-2 modulation by homocysteine. *Mol Cell Biochem* 2015; **406**: 139–49.
- 432 Cheng S-L, Shao J-S, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 2003; **278**: 45969–77.
- 433 Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, Kawakami Y, Ikeda Y. Human circulating CD14⁺ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukoc Biol* 2003; **74**: 833–45.
- 434 Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 2004; **110**: 2226–32.
- 435 Cheng S-L, Shao J-S, Behrmann A, Krchma K, Towler DA. Dkk1 and MSX2-Wnt7b signaling reciprocally regulate the endothelial-mesenchymal transition in aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; **33**: 1679–89.
- 436 Yao J, Guihard PJ, Blazquez-Medela AM, Guo Y, Moon JH, Jumabay M, Boström KI, Yao Y. Serine Protease Activation Essential for Endothelial-Mesenchymal Transition in Vascular Calcification. *Circ Res* 2015; **117**: 758–69.
- 437 Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **286**: E686–696.

- 438 Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber D, Virmani R. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation* 2002; **105**: 297–303.
- 439 Clarke MCH, Littlewood TD, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Bennett MR. Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ Res* 2008; **102**: 1529–38.
- 440 Bidder M, Shao J-S, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Semenkovich CF, Towler DA. Osteopontin transcription in aortic vascular smooth muscle cells is controlled by glucose-regulated upstream stimulatory factor and activator protein-1 activities. *J Biol Chem* 2002; **277**: 44485–96.
- 441 Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2000; **102**: 1186–91.
- 442 Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, Tada N, Ohsuzu F. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res* 2002; **91**: 77–82.
- 443 Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 1161–70.
- 444 Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in renal disease. *Clin Nephrol* 2005; **63**: 146–57.
- 445 Lampropoulos CE, Kalamara P, Konsta M, Papaioannou I, Papadima E, Antoniou Z, Andrianopoulou A, Vlachoyiannopoulos PG. Osteoporosis and vascular calcification in postmenopausal women: a cross-sectional study. *Climacteric J Int Menopause Soc* 2016; **19**: 303–7.
- 446 Kammler J, Blessberger H, Lambert T, Kellermair J, Grund M, Nahler A, Lichtenauer M, Schwarz S, Reiter C, Steinwender C, Kypta A. In-stent restenosis after interventional treatment of carotid artery stenoses: a long-term follow-up of a single center cohort. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc* 2017; **106**: 493–500.
- 447 Tosaka A, Soga Y, Iida O, Ishihara T, Hirano K, Suzuki K, Yokoi H, Nanto S, Nobuyoshi M. Classification and clinical impact of restenosis after femoropopliteal stenting. *J Am Coll Cardiol* 2012; **59**: 16–23.
- 448 Katano H, Nishikawa Y, Yamada H, Mase M. Calcification in original plaque and restenosis following carotid artery stenting. *Surg Neurol Int* 2017; **8**: 279.
- 449 Katano H, Mase M, Nishikawa Y, Yamada H, Yamada K. Analysis of Recurrent Stenosis After Carotid Endarterectomy Featuring Primary Plaque Calcification. *Neurosurgery* 2017; **80**: 863–70.
- 450 Yao E-H, Fukuda N, Ueno T, Matsuda H, Nagase H, Matsumoto Y, Sugiyama H, Matsumoto K. A pyrrole-imidazole polyamide targeting transforming growth factor-beta1 inhibits restenosis and preserves endothelialization in the injured artery. *Cardiovasc Res* 2009; **81**: 797–804.