

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Biochimie – Biologie cellulaire

Présentée et soutenue par :

Jérémy ORTILLON

Le 22 décembre 2017

Thèse dirigée par **Fatouma TOURE**

Rôle de l'interaction AGE-RAGE dans un modèle de vieillissement vasculaire : la vasculopathie urémique

Membres du jury :

M. Philippe GILLERY	Professeur des universités, Praticien hospitalier	CNRS, URCA	, Président du jury
Mme. Fatouma TOURE	Professeur des universités, Praticien hospitalier	CNRS, URCA	, Directrice de thèse
M. Frédéric JAISSE	Professeur des universités, Praticien hospitalier	INSERM, Paris	, Rapporteur
M. Stéphane BURTEY	Professeur des universités, Praticien hospitalier	INSERM, Marseille	, Rapporteur
M. Patrick LACOLLEY	Directeur de recherche	INSERM, Nancy	, Examinateur
Mme. Nathalie HEZARD	Docteur en médecine, Praticien hospitalier	CHU Reims	, Examinateur
M. Philippe RIEU	Professeur des universités, Praticien hospitalier	CNRS, URCA	, Membre invité
M. Pascal MAURICE	Chargé de recherche	CNRS, URCA	, Membre invité



Résumé

Les évènements cardiovasculaires sont la première cause de mortalité chez les patients insuffisants rénaux chroniques. Ces complications font suite à des modifications structurelles et fonctionnelles de la paroi vasculaire regroupées sous le terme de vasculopathie urémique. Parallèlement à ces modifications vasculaires, l'urémie s'accompagne d'une accumulation de substances non épurées par le rein appelées toxines urémiques, telles que les produits de la glycation avancée (AGEs) ou les ligands de RAGE. Ces toxines peuvent interagir avec leur récepteur, RAGE, qui est pro-inflammatoire et impliqué dans le remodelage artériel. Cette thèse a consisté en l'étude, chez la souris, du rôle de l'accumulation des ligands de RAGE et de leur interaction avec celui-ci dans le développement de l'athérosclérose, des calcifications vasculaires et de la thrombose artérielle au cours de l'insuffisance rénale chronique (IRC). Dans un premier temps, nous avons montré que l'IRC conduisait à une accumulation des AGEs et des ligands de RAGE sériques et tissulaires, ainsi qu'une augmentation de l'expression de RAGE au sein de la paroi vasculaire participant à la formation des plaques d'athérome. Dans un second temps, nous avons démontré que RAGE participait aux calcifications vasculaires favorisant l'expression de co-transporteur de phosphate inorganique (Pit-1), induisant la différenciation des cellules musculaires lisses en cellules « osteoblast-like ». Enfin, nous avons montré que RAGE participait à la formation d'un thrombus artériel dû à une hyperactivité plaquettaire. En conclusion, cette thèse a permis de renforcer le concept que l'axe ligands de RAGE/RAGE est un acteur important dans la vasculopathie urémique.

Mots clés : Produit de glycation avancée, RAGE, insuffisance rénale chronique, vasculopathie urémique

Abstract

Cardiovascular events are the primary cause of morbidity and mortality in chronic kidney disease patients. These complications are due to structural and functional changes in the vascular wall named uraemic vasculopathy. Alongside these vascular changes, uremia is accompanied by the retention of various solutes that are normally excreted by the kidneys called uremic toxins, such as the products of advanced glycation (AGEs) or the ligands of RAGE. These toxins may interact with their receptor, RAGE, which is pro-inflammatory and involved in arterial remodeling. The aim of this thesis was to study, in mice, the role of the accumulation of RAGE ligands and their interaction with it in the development of atherosclerosis, vascular calcification and arterial thrombosis in chronic renal failure (CKD). Initially, we showed that CKD leads to an accumulation of serum and tissue AGEs and RAGE ligands, as well as an increase in RAGE expression in the vascular wall involved in atheroma plaque formation. Secondly, we have demonstrated that RAGE is involved in vascular calcification promoting the expression of inorganic phosphate cotransporter (Pit-1), inducing the differentiation of smooth muscle cells "osteoblast-like". Finally, we showed that RAGE participated in the formation of arterial thrombus due to platelet hyperactivity. In conclusion this thesis consolidates that RAGE-RAGE ligands axis is an important actor in uremic vasculopathy.

Keywords : Advanced glycation end-products, RAGE, chronic kidney disease, uremic vasculopathy

Remerciements

Ma thèse de doctorat s'est effectuée au sein de l'unité UMR URCA/CNRS 7369 "Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC) " et je tiens dans un premier temps à remercier son directeur, Monsieur le Professeur Laurent Martiny, ainsi que son ancien directeur Monsieur le Professeur François-Xavier Maquart.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude et mon plus grand respect à Madame le Professeur Fatouma Touré pour m'avoir accepté comme étudiant en thèse, de m'avoir encadré durant l'ensemble de ce travail, et fourni tous les moyens nécessaires afin de le mener à bien. Merci de m'avoir fait confiance durant ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Philippe Gillery pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je présente mes remerciements à Monsieur le Professeur Stéphane Burtey et Monsieur le Professeur Frédéric Jaisser de me faire l'honneur d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie également Monsieur le Docteur Patrick Lacolley d'avoir accepté de siéger à mon jury de thèse en tant qu'examinateurs de ce travail de thèse.

Je tiens également à adresser mes plus sincères remerciements à Madame le Docteur Nathalie HEZARD pour avoir accepter d'examiner ce travail, ainsi que pour ces trois années de collaboration. Vous m'avez apporté de précieux conseils au quotidien, mais aussi pour votre gentillesse et votre écoute qui ont été source de motivation et de réconfort.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Philippe Rieu pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et du service de Néphrologie de Reims. Je vous remercie également pour vos conseils, l'aide financière que vous m'avez apportée me permettant ainsi de présenter mes résultats lors de congrès, et également d'avoir accepté de siéger dans ce jury en tant que membre invité.

J'associe à ces remerciements le Docteur Pascal Maurice pour son aide et le temps considérable qu'il m'a accordé. Merci pour votre appui et nos longues discussions scientifique. Vos connaissances et votre parcours a toujours été pour moi une source d'inspiration.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur Philippe Nguyen pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et participer activement au travail de cette thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement à toute les personne de l'unité MEDyC, à Monsieur le Professeur Laurent Debelle mais également à Monsieur le Professeur Manuel Dauchez pour vos conseils et vos discussions qui m'ont beaucoup aidé durant ce travail.

Au docteur Stéphane Jaisson pour son aide lors de ce travail. Ta gentillesse quotidienne lors de nos conversations dans le couloir ainsi que tes conseils m'ont beaucoup aidé.

Je remercie également le Docteur Laurent Duca pour m'avoir donné le goût de la recherche dès ma deuxième année de licence et son soutien tout au long de mon parcours universitaire. Je te remercie pour tous les conseils scientifiques, les rigolades, les parties de HALO, de m'avoir remonté le moral, ainsi que tous les moments passés à discuter ensemble.

Merci au docteur Sébastien Blaise et Béatrice Romier-Crouzet pour m'avoir fait découvrir *l'in vivo* lors de mon cursus universitaire, ainsi que votre aide et vos encouragements. Merci également au Docteur Bertrand Brassart pour son aide lorsque j'avais besoin de réponses sur diverses expériences, ainsi qu'aux Docteurs Sylvie Pasco-Brassart, Stéphane Brézillon, Hervé Sartelet et Amar Bennasroune pour toutes vos explications et votre générosité.

Je remercie le docteur Karim Belmokhtar, pour m'avoir pris sous son aile depuis mon master 1. Tu m'as montré ce que c'était d'être investit dans son travail. Merci pour nos longues conversations autant scientifiques que personnelles et philosophiques.

Je tiens à remercier le Docteur Christine Terryn, pour son implication lors de ce travail, ainsi que son temps consacré lors de mises au point expérimentales.

Un grand merci à Aurélie Dupont, Corinne Perreau, Catherine Lejeune, Gwen Perro, Mélanie Vanin, Floriane Oszust pour une multitude de raisons : votre disponibilité, votre gentillesse, votre soutien, vos conseils et le temps que vous m'avez attribué. Merci pour votre bonne humeur et surtout de rire à mes blagues même quand elles n'étaient pas drôles.

Merci également au personnel du laboratoire d'hématologie, à Florence, Gérard, Gael, Elodie, Véronique et Marie pour leur accueil. Un grand merci à

Valérie pour son aide, sa patience, ses conseils, mais également pour ton soutien.

Mille mercis à vous les filles : Charlotte pour m'avoir apporté ton enthousiasme et ton aide, Aurore pour tes encouragements, Laëtitia pour tout l'aide que tu m'as apporté depuis le master 2, tes conseils, ton coaching sportif et ta gentillesse, Charlène pour ta douceur et ton écoute, Manon pour ton énergie débordante et ton sourire. Merci Rida pour ta gentillesse, ton soutien et les discussions diverses.

Merci la Wahart ou « nez de bœuf » pour tous les bons moments passés à discuter, à nos franches rigolade, à nos prises de bec. Merci pour tout, merci de ton amitié et merci d'avoir été présente quand ça n'allait pas.

Les filles je sais que j'ai parfois ou plutôt souvent été chiant mais c'est parce que je vous adore énormément.

Je remercie également mon binôme alexandre pour tous les moments de détente passés ensemble.

Je tenais également à remercier Camille, qui a toujours été présente pour me supporter surtout en cette période de fin de thèse, pour m'aider pour tout et n'importe quoi, de m'avoir réconforté quand je broyais du noir, mais également de m'avoir encouragé tout au long de cette thèse.

Je terminerai par ma famille, même si je ne le dis pas assez je vous remercie pour tout ce que vous faites pour moi.

Table des matières

Liste des abréviations	9
Liste des illustrations.....	13
Chapitre I : Introduction	16
I. Situation du sujet	17
II. Insuffisance rénale chronique.....	19
1. Epidémiologie.....	19
2. Diagnostic.....	19
2.1. Affirmer la MRC	20
2.2. Préciser le stade de la MRC	21
2.3. Diagnostique étiologique	21
3. Prise en charge et traitements de suppléance.....	23
3.1. Évaluer et prendre en charge les facteurs de progression de la MRC	23
3.2. Traitements de suppléance	24
3.2.1 Transplantation rénale	24
3.2.2 Epuration extra-rénale	24
4. Conséquences cardiovasculaires liées à l'IRC.....	25
III. Structure de la paroi artérielle normale.....	26
1. Généralités	26
2. Cellules de la paroi	27
2.1. Intima.....	27
2.2. Media.....	28
2.3. Adventice.....	29
3. Matrice extracellulaire.....	29
3.1. Collagènes	30
3.1.1 Généralités	30
3.1.2 Collagènes fibrillaires.....	31
3.2. Fibres élastiques	33
3.2.1 Généralités	33
3.2.2 Elastogénèse.....	33
3.2.3 Architecture.....	34
3.2.4 Dégradation	35
4. Protéoglycannes	36
5. Les glycoprotéines de structure	37
IV. Physiopathologie du remodelage de la paroi vasculaire.....	38
1. Athérosclérose	38
1.1. Classification.....	38
1.2. L'athérogenèse.....	41
2. Athérothrombose.....	45
2.1. Fissuration et rupture de la plaque	45
2.1.1 Facteurs extrinsèques	46
2.1.2 Facteurs intrinsèques.....	46
2.2. La thrombose.....	47
2.2.1 Thrombogénicité de la plaque	48
2.2.2 Rôle des plaquettes	48
V. Particularité du remodelage vasculaire au cours de l'IRC : vasculopathie urémique	53
1. Complications liées à la vasculopathie urémique	53
2. Particularité de l'athérogenèse et de la thrombose au cours de l'IRC	57
2.1. Dysfonction endothéliale	57
2.2. Inflammation chronique	58
2.3. Dysfonction plaquettaire	58
3. Les calcifications vasculaires	59
3.1. Mécanismes des calcifications vasculaires	60
VI. Récepteur des produits de glycation avancée : RAGE	63

1. Découverte et rôle de RAGE	63
2. Ligands de RAGE	63
2.1. Les produits de la glycation avancée	63
2.2. Autres ligands de RAGEs	66
2.2.1 Les protéines de la famille de S100.....	66
2.2.2 Sérum Amyloïde A	67
2.2.3 High Mobility Group Box protein-1 (HMGB-1)	67
3. Structure de RAGE	68
4. Régulation de l'expression et de l'activité de RAGE.....	70
4.1. Régulation de la transcription de RAGE	70
4.2. Régulation par épissage alternatif	71
4.3. Régulations post-traductionnelles.....	71
4.3.1 Glycosylation.....	71
4.3.2 Clivage de RAGE.....	71
5. Signalisation	72
6. Rôle de RAGE dans le remodelage vasculaire.....	74
6.1. Rôle dans l'athérosclérose et la thrombose	74
6.2. Rôle dans les calcifications vasculaires.....	75
VII. Toxines urémiques	75
VIII. Hypothèses de travail	77
Chapitre II : Résultats.....	78
Article 1 :	
Signaling of Serum Amyloid A Through Receptor for Advanced Glycation End Products as a Possible Mechanism for Uremia-Related Atherosclerosis	79
Belmokhtar K, Robert T, <u>Ortillon J</u> , Braconnier A, Vuiblet V, Boulagnon-Rombi C, Diebold MD, Pietrement C, Schmidt AM, Rieu P, Toure F	
Article 2 :	
Receptor for advanced glycation end products (RAGE) : A key molecule in the genesis of CKD vascular calcification and a potential modulator of sodium phosphate co-transporter PiT-1 expression. (En révision)	101
Belmokhtar K*, <u>Ortillon J*</u> , Jaisson S, Massy ZA, Boulagnon-Rombi C, Günter F Gillary P, Schmidt AM, Rieu P, Toure F	
Article 3 :	
Signaling through Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) is involved in Chronic Kidney Disease related arterial thrombosis.....	147
<u>Ortillon J</u> , Hezard N, Belmokhtar K, Kawecki C, Terryn C, Schmidt A-M, Nguyen P, Rieu P, Maurice P, Touré F	
Chapitre III : Discussion générale et perspectives	188
Annexes.....	201
Références bibliographiques	204

Liste des abréviations

ADAM : A disintegrin and metalloproteinase
ADMA : Asymmetric dimethylarginine
ADP : Adénosine diphosphate
AGE : Produit de glycation avancée
AHA : American Heart Association
AP-2 : Activating protein factor 2
BMP : Bone morphogenetic protein
BSA : Albumine sérique bovine
CaSR : Récepteur sensible au calcium
CDP : Produits de carbamylation
CIV : Cellules interstitielles valvulaires
CMLv : Cellules musculaires lisses vasculaires
CPE : Cellule progénitrices endothéliales
CRP : Protéine C-réactive
CV : Calcifications vasculaires
DE : Dysfonction endothéliale
DFG : Débit de filtration glomérulaire
EBP : Elastin binding protein
EDHF : Endothelium-derived hyperpolarizing factor
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
FACIT : Collagène à triple hélice interrompue associés aux fibrilles
FT : Facteur tissulaire
GAG : Glycosaminoglycans
GP : Glycoprotéine
HAS : Haute autorité de la santé
HDL : High density lipoprotein
HMGB1 : High mobility group box 1
HSP : Heat shock proteins
HTA : Hypertension artérielle
HVG : hypertrophie ventriculaire gauche
ICAM : Intercellular adhesion molecule
IL : Interleukine
IRA : Insuffisance rénale aigüe
IRC : Insuffisance rénale chronique

IRCT : Insuffisance rénale chronique terminale

LDL : Low density lipoprotein

cLDL : LDL carbamylées

oxLDL : LDL oxydées

MAGP : Glycoprotéine associées aux microfibrilles

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MCP : Monocyte chemoattractant protein

mDia1 : Diaphanous-related formin-1

MGP : Matrix Gla protein

MEC : Matrice extracellulaire

MMP : Métalloprotéinase matricielle

MRC : Maladie rénale chronique

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NET : Neutrophils extracellular traps

NF-κB : Nuclear factor-kappa B

NO : Nitric Oxyde

eNOS : endothelial nitric oxide synthase

OMS : Organisation mondiale de la santé

OPN : Ostéopontine

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1

PAL : Phosphatase alcaline

PAR : Protease activated receptor

PG : Protéoglycannes

PGI2 : Prostaglandine I2

Pit-1 : Co-transporteur de phosphate/sodium

PKC : Protéine kinase C

PNN : Plynucréaires neutrophiles

PRP : Plasma riche en plaquettes

PRR : pattern recognition receptor

RAGE : Récepteur aux produits de glycation avancée

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RER : Réticulum endoplasmique rugueux

ROS : Reactive Oxygen Species

Runx2 : Runt-related transcription factor 2

SAA : Sérum amyloïde A

Sp-1 : Specificity protein 1

STAT : Signal transducer and activator of transcription

TGF : Transforming growth factor

TIRAP : Toll-interleukin adaptor protein

TLR : Toll-like receptor

TXA2 : Thromboxane A2

VCAM : Vascular cell-adhesion molecule

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VOP : Vitesse d'onde de pouls

vWF : Facteur von Willebrand

Liste des illustrations

<i>Figure 1 : Répartition des maladies rénales ayant conduit à une insuffisance rénale terminale en France en 2015. (D'après les données du rapport annuel REIN, [4])</i>	22
<i>Figure 2 : Représentation schématique des différentes couches de la paroi vasculaire artérielle.</i>	26
<i>Figure 3 : Représentation schématique du rôle de l'endothélium vasculaire.</i>	27
<i>Figure 4 : Représentation schématique de la synthèse de collagène de type I.</i>	32
<i>Figure 5 : Représentation schématique d'une fibre élastique.</i>	35
<i>Figure 6 : Représentation schématique des forces de cisaillement liées à la formation de plaque d'athérome.</i>	41
<i>Figure 7 : Représentation schématique du développement de la plaque d'athérome.</i>	44
<i>Figure 8 : Représentation schématique de la formation d'un thrombus artériel suite à la rupture (à gauche) ou l'érosion (à droite) de la plaque d'athérome.</i>	45
<i>Figure 9 : Représentation schématique des différents facteurs intervenant dans la fragilité de la plaque d'athérome conduisant à la formation d'un thrombus.</i>	47
<i>Figure 10 : Photographie par microscope électronique à balayage de plaquettes.</i> ..	50
<i>Figure 11 : Photographie par microscopie électronique à transmission de plaquettes au repos et la présence de différentes organelles.</i>	50
<i>Figure 12 : Représentation schématique des différentes phases de l'activation plaquettaire par le sous-endothélium.</i>	52
<i>Figure 13 : Proportions des différents types de lésions athérosclérotiques en fonction du stade d'IRC.</i>	54
<i>Figure 14 : Facteurs et mécanismes favorisant des atteintes cardiovasculaires au cours de l'IRC.</i>	56
<i>Figure 15 : Représentation schématique des principaux acteurs de la calcification vasculaire.</i>	62
<i>Figure 16 : Représentation schématique des différentes voies conduisant à la formation des AGEs.</i>	64
<i>Figure 17 : Représentation schématique de la formation de produits de glycation avancée.</i>	65
<i>Figure 18 : Représentation schématique des différentes formes de RAGE.</i>	69

<i>Figure 19 : Assemblage de deux domaines V-C1 de RAGE.</i>	70
<i>Figure 20 : Représentation schématique des principales voies de signalisation induites par RAGE.</i>	73
<i>Figure 21 : Représentation de signaux effectués au niveau de la crosse aortique et de l'aorte abdominale. (modifié d'après Hartley [291])</i>	193
<i>Figure 22 : Cinétique de la vitesse de l'onde de pouls au cours de l'IRC chez des souris rendues urémiques délestées ou non pour RAGE</i>	194
<i>Tableau 1 : Stades de la Maladie Rénale Chronique</i>	21
<i>Tableau 2 : Classification des lésions de l'athérosclérose, adapté d'après Stary [52]</i>	40
<i>Tableau 3 : Représentation des principales toxines retrouvées au cours de l'IRC</i>	76

Chapitre I : Introduction

I. Situation du sujet

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le monde connaît un vieillissement rapide de sa population lié à une augmentation de l'espérance de vie. Entre 2015 et 2050, la proportion des 60 ans et plus va doubler, passant de 12% à 22% de la population mondiale, et d'ici 2050, il a été estimé que cette population atteindra 2 milliards de personnes, contre 900 millions en 2015 [1]. Cependant, cette augmentation de la longévité dépend fortement d'un facteur clé : la santé. D'un point de vue biologique, le vieillissement est le produit de l'accumulation d'un vaste éventail de dommages moléculaires et cellulaires au fil du temps. Ces derniers entraînent une dégradation progressive des capacités physiques et mentales, une majoration du risque de maladie et, enfin, le décès.

Une des complications associées à ce vieillissement est l'augmentation de l'incidence et de la prévalence des maladies chroniques telles que l'Insuffisance Rénale Chronique (IRC). Ces affections chroniques engendrent des complications notamment vasculaires, qui sont délétères pour la qualité de vie des patients mais induisent également des coûts importants pour le système de santé. En France, selon la Haute Autorité de Santé (HAS), le nombre de personnes atteintes d'une maladie rénale chronique peut-être estimé à près de 3 millions. Le risque d'évolution vers le stade terminal nécessitant la dialyse ou une greffe rénale est faible dans l'absolue et représente environ 11 000 nouveaux cas par an, mais ce nombre augmente de 4% par an [2]. Les événements cardiovasculaires sont la première cause de mortalité chez les patients insuffisants rénaux chroniques [3], [4].

Devant ces données alarmantes, il est donc fondamental de renforcer nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans le développement des complications cardiovasculaires au cours de l'IRC, pouvant conduire à de nouvelles approches dans la prise en charge et ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ces complications vasculaires font suite à des modifications structurelles et fonctionnelles de la paroi vasculaire regroupées sous le terme de vasculopathie urémique. Les modifications de la matrice extracellulaire telles que l'augmentation de la proportion de collagène et la diminution de la composante élastique, font partie intégrante de ce processus qui est composé principalement de lésions

athérosclérotiques, pouvant aller jusqu'à la formation d'athérothrombose, ainsi que la calcification vasculaire [5], [6].

Parallèlement à ces modifications vasculaires, l'urémie s'accompagne d'une accumulation de substances non épurées par les reins appelées toxines urémiques. Parmi elles, les produits de la glycation avancée (AGE) et les ligands de RAGE sont des toxines, accumulées au cours de l'IRC, favorisées par un défaut d'élimination mais également par une augmentation de leurs synthèses. Les effets délétères de ces toxines sont principalement liés à leurs interactions avec le récepteur des produits de la glycation avancée (RAGE).

Le RAGE est impliqué dans de nombreux processus pathologiques tels que le diabète, l'inflammation, les maladies infectieuses et neurodégénératives et le cancer. RAGE et ses ligands sont également impliqués dans le remodelage vasculaire, notamment au cours du diabète. Cependant le rôle de l'interaction AGE-RAGE dans les modifications vasculaires liées à l'IRC est mal connu.

Le travail de ma thèse a eu pour but d'étudier le rôle de l'axe AGE-RAGE au cours de la vasculopathie urémique : sur le développement de l'athérosclérose sur la formation d'un thrombus artériel et sur les calcifications vasculaires.

II. Insuffisance rénale chronique

1. Epidémiologie

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est la résultante de la perte progressive des fonctions des reins. L'IRC est la conséquence de la destruction du nombre de néphrons fonctionnels causée par des maladies diverses affectant les reins ou les voies excrétrices, se traduisant par un ensemble d'altérations cliniques et biologiques qui induisent le syndrome urémique. Lorsque le niveau de la fonction rénale devient inférieur à un seuil critique, défini comme l'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT), le maintien de l'homéostasie n'est plus possible et le recours au traitement de suppléance par dialyse ou une transplantation s'impose.

Au niveau mondial le nombre de personnes atteintes d'IRCT en 2010, ayant reçu une greffe rénale est d'environ 2,62 millions et environ 2,05 millions de patients ont commencé à être traités par dialyse. Il est estimé que 2,3 à 7,1 millions de personnes sont mortes prématurément durant cette année, parce qu'elles n'ont pas eu accès à un traitement de suppléance. La plupart de ces décès sont survenus dans des pays à faible revenu principalement dans les continents d'Asie, d'Afrique ou d'Amérique latine. Il est calculé que d'ici 2030, le nombre de personne ayant besoin de greffe rénale soit doublé [7].

En France, le nombre de personnes qui ont été traité pour une IRCT, en 2015 est de 82 300, dont 11 000 nouveaux patients durant l'année. L'IRCT touche toutes les tranches d'âge, les personnes âgées constituent la majorité des patients incidents, avec un âge médian de 70 ans. Parmi les patients traités d'IRT, 55,7% le sont par dialyse et 44,3% par greffe rénale, avec une prévalence au totale de 1232 patients par million d'habitants. La prévalence chez les hommes est 1,7 fois plus élevée que chez les femmes. Ces patients se caractérisent par des comorbidités associées fréquentes notamment le diabète (45% des cas) et les comorbidités cardio-vasculaires (58% des cas) telles que l'hypertension artérielle, et dont la fréquence augmente avec l'âge [4].

2. Diagnostic

L'IRC est définie par une diminution permanente du DFG au-dessous de la limite inférieure des valeurs normales pour l'âge et le sexe. Le développement d'une IRC est la

complication majeure des maladies rénales chronique (MRC) et son degré est quantifié en stade de sévérité croissante en fonction du niveau de DFG, reflet de la valeur fonctionnelle globale des reins.

2.1. Affirmer la MRC

- Evaluer le DFG :

Il peut être évalué par mesure de la clairance de traceurs exogènes qui sont filtrés par le glomérule, mais qui ne sont ni réabsorbés, ni métabolisés, ni sécrétés dans le tubule rénal comme l'inuline, l'iotalamate ou l'iohexol.

Il est plus souvent estimé à partir de la créatinine sérique, de l'âge, du poids, de la taille et de l'éthnie du patient. Pour cela plusieurs formules permettent d'estimer le DFG.

Selon la formule de Cockcroft et Gault

$$DFG = \frac{(140 - \text{âge}) \times \text{poids (Kg)}}{\text{Créatininémie } (\mu\text{mol/L})} \times f$$

$f = 1,23$ chez un homme ou $1,04$ chez une femme

Selon la formule du MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*)

$$DFG = 186 \times (\text{Créatininémie} \times 0,0113)^{-1,154} \times \text{âge}^{-0,203} \\ \times (1,21 \text{ si africain}) (\times \text{ si femme } 0,742)$$

Selon la formule CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease – Epidemiology Collaboration*)

$$DFG = 141 \times \min \left(\frac{\text{Créatininémie}}{\kappa, 1} \right)^\alpha \times \max \left(\frac{\text{Créatininémie}}{\kappa, 1} \right)^{-1,209} \\ \times 0,993^{\text{âge}} (\times 1,018 \text{ si femme}) (\times 1,159 \text{ si africain})$$

$K = 62$ pour les femmes et 80 pour les hommes

$\alpha = -0,329$ pour les femmes et $-0,411$ pour les hommes

min et max indiquent le minimum ou le maximum de Crétatinnémie/ K ou 1

Pour affirmer la maladie renale, il faut également :

- Savoir s'il existe une protéinurie
- Savoir s'il existe une anomalie de sédiment urinaire (hématurie, leucocyturie)
- Savoir s'il existe une anomalie morphologique des reins ou des voies urinaires.

Le caractère chronique de la maladie rénale est évoqué sur plusieurs critères. Des critères anamnestiques comme les antécédents de maladie rénale, l'antériorité à une créatininémie élevée ou la présence ancienne d'une protéinurie. Des critères morphologiques avec une diminution de la taille des reins observée par échographie rénale. Mais également des critères biologiques comme l'anémie ou l'hypocalcémie.

Certaines exceptions sont toutefois observées : au cours du diabète ou de l'amylose, l'apparition d'une IRC ne se traduit pas par une diminution de la taille des reins, le phénomène d'hypocalcémie, retrouvé au cours de l'IRC, n'est pas retrouvé lors de myélomes ou de métastases osseuses.

Une maladie rénale chronique est définie comme évoluant depuis plus de trois mois.

2.2. Préciser le stade de la MRC

Le stade de MRC repose sur la mesure ou l'estimation du DFG, et permet de définir 5 stades de MRC. Ce classement en différents stades progressifs de la maladie permet une prise en charge spécifique (Tableau 1).

Tableau 1 : Stades de la Maladie Rénale Chronique

Stade	Description	DFG (ml/min/1,73m ²)
1	Maladie rénale chronique où les fonctions rénales sont normales	≥ 90
2	Maladie rénale chronique avec insuffisance rénale chronique légère	60 - 89
3A	Insuffisance rénale chronique modérée	45 - 59
3B	Insuffisance rénale chronique modérée	30 - 44
4	Insuffisance rénale chronique sévère	15 - 29
5	Insuffisance rénale chronique terminale	> 15

2.3. Diagnostique étiologique

L'étiologie de la maladie rénale chronique est importante à rechercher, elle peut impliquer une prise en charge thérapeutique spécifique. Le diagnostique étiologique se

base sur les examens cliniques et biologiques ainsi que sur l'interrogation du patient. Cela permet de repérer les facteurs de risque cardiovasculaire de la MRC tels que le diabète ou l'hypertension artérielle. Mais également sur les antécédents personnels avec la prise de substances néphrotoxiques, ou familiaux de néphropathie comme par exemple la polykystose rénale autosomique dominante.

Les maladies conduisant à l'IRC sont très variées. Le rythme de leur progression vers l'IRCT est également très variable d'un cas à l'autre. Certaines maladies affectent primitivement les reins, alors que d'autres sont secondaires à des pathologies touchant l'ensemble de l'organisme, telles que le diabète, l'hypertension artérielle ou les maladies systémiques. L'épidémiologie de l'IRCT en France est connue grâce à la mise en place du programme REIN (Réseau épidémiologie et information en néphrologie), produisant des rapports annuels sur l'incidence et la prévalence de l'IRT.

Les causes d'une insuffisance rénale chronique peuvent être multiples. Les néphropathies diabétiques ou l'hypertension artérielle sont responsables de 47% des patients atteints d'IRC. Les glomérulonéphrites, les néphropathies interstitielles et héréditaires sont également des causes d'IRC (Figure 1). Toutes ces complications sont la cause de l'apparition d'une fibrose rénale interstitielle.

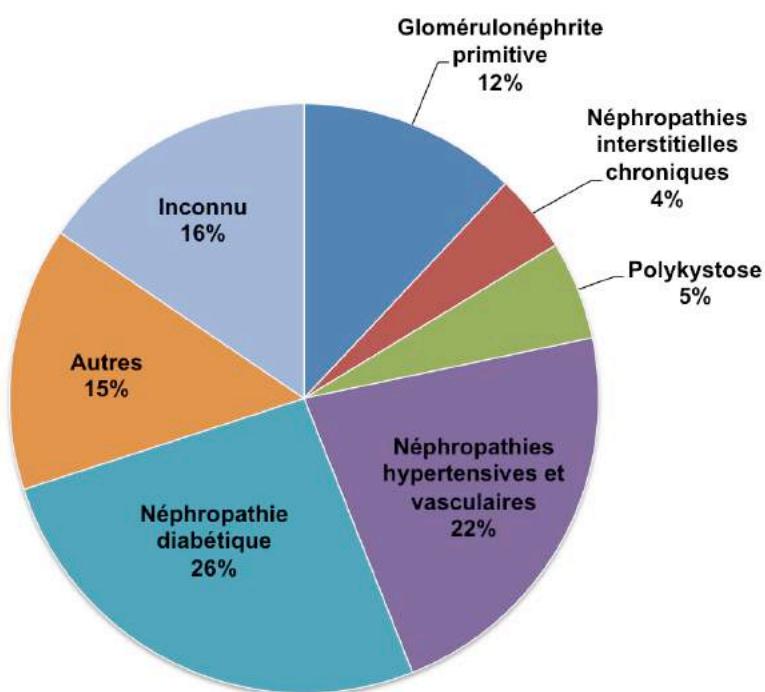


Figure 1 : Répartition des maladies rénales ayant conduit à une insuffisance rénale terminale en France en 2015. (D'après les données du rapport annuel REIN, [4])

3. Prise en charge et traitements de suppléance

3.1. Évaluer et prendre en charge les facteurs de progression de la MRC

Il est important d'apprécier l'évolution de la MRC, déclinant vers un stade terminal. Pour cela, la vitesse de progression est estimée à partir du DFG en calculant le déclin annuel de DFG (DFG année_n- DFG année_{n+1}) avec un déclin « physiologique » (observé après 40 ans : < 2mL/min/1,73m²/an), « modéré » (entre 2 et 5mL/min/1,73m²/an) et « rapide » (> 5mL/min/1,73m²/an).

Afin de ralentir la progression de la maladie, il faut mettre en place :

- Contrôle de la pression artérielle

Le contrôle de la pression artérielle est important car il permet de ralentir efficacement la progression de l'IRC et également de diminuer les risques de complications cardio-vasculaires.

- Restriction protidique

Une diminution des apports protéiques même modérée permet un ralentissement de la progression de l'IRC. Un apport protéique entre 0,8 à 1g/kg/jour est donc recommandé chez les patients atteints d'IRC.

- Prévention des épisodes d'insuffisance rénale aiguë (IRA)

Lors de l'IRC des épisodes d'IRA peuvent survenir, impliquant l'aggravation de l'IRC via déshydratation, utilisation de certains médicaments néphrotoxiques ou encore l'apparition d'une obstruction voire une pathologie rénale surajoutée.

- Métabolisme diabétique

Une attention particulière doit être portée chez les patients diabétiques. Il est primordial de contrôler leur diabète car il a été mis en évidence que l'hyperglycémie entraîne initialement une vasodilatation systémique et rénale aboutissant indirectement à une augmentation de la filtration glomérulaire. Un épaississement de la membrane glomérulaire est observé histologiquement conduisant cliniquement à une élévation de l'excrétion urinaire d'albumine, favorisée par des lésions des podocytes, des cellules épithéliales situées dans la chambre glomérulaire, ainsi que des lésions tubulaires limitant la réabsorption de l'albumine filtrée. Cette hyperfiltration est réversible si l'hyperglycémie disparaît, cependant si elle persiste, des lésions de glomérulosclérose et

de fibrose tubulaire s'installeront de manière irréversible avec l'apparition d'une insuffisance rénale.

- Tabagisme

L'arrêt de la consommation de tabac est indispensable chez les patients atteints de MRC, puisqu'il favorise la progression de la MRC.

3.2. Traitements de suppléance

Lorsque la maladie atteint un stade terminal avec un DFG inférieur à 15 mL/min/1,73m² il est nécessaire pour les patients d'avoir recours à un traitement de suppléance de la fonction rénale. Il existe trois types de traitements : la transplantation rénale, l'hémodialyse et la dialyse péritonéale. L'épuration extra rénale, est le plus souvent effectuée en premier lieu, mais la réalisation d'une greffe préemptive, avant d'atteindre le stade terminal, est le choix le plus idéal.

3.2.1 Transplantation rénale

La transplantation rénale, lorsqu'elle est réalisable, est la meilleure méthode de suppléance de la fonction rénale par rapport à l'hémodialyse et la dialyse péritonéale. En effet, celle-ci améliore considérablement la qualité de vie avec une espérance de vie supérieure. La plus grande contrainte de cette technique est due à la faible disponibilité de greffons.

3.2.2 Epuration extra-rénale

L'hémodialyse est la technique la plus utilisée en France, elle permet d'augmenter la durée de vie d'environ 20 ans. C'est une technique contraignante qui dure entre 4 et 6 heures et doit être réalisée en général 3 fois par semaine. Elle se réalise par voie vasculaire, où le sang est filtré dans une circulation extracorporelle à travers une membrane artificielle.

La dialyse péritonéale est beaucoup moins utilisée en France, cette technique utilise le péritoine comme filtre *via* la pose d'un cathéter de dialyse inséré chirurgicalement. Elle est moins coûteuse que l'hémodialyse et est mieux tolérée.

4. Conséquences cardiovasculaires liées à l'IRC

Les atteintes cardiovasculaires sont les complications cliniques les plus sévères de l'urémie chronique, car elles sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importantes [8], [9].

Plus d'un patient sur deux est atteint de complications cardiovasculaires, parmi celles-ci l'insuffisance cardiaque et la pathologie coronarienne concerne 26 et 27% des cas, suivies des troubles du rythme cardiaque (24%) et de l'artériopathie chronique oblitérante des membres inférieurs (20%) [4].

Elles font intervenir plusieurs mécanismes et se développent dès le stade débutant de l'IRC, impliquant la nécessité de traiter préventivement les patients de ces complications. Ces atteintes sont la conséquence de l'hypertension artérielle et des altérations métaboliques multiples associées à l'IRC, entraînant un remodelage cardiaque et artériel. Parmi eux, une athérosclérose accélérée qui touche tous les territoires artériels, notamment le réseau coronaire, et la formation de dépôts phosphocalciques dans la média des artères et dans les valves cardiaques.

Il en résulte une hypertrophie avec fibrose du ventricule gauche, une cardiopathie ischémique et des accidents thrombose-occlusifs touchant tous les territoires artériels.

Nous allons dans un premier temps exposer les processus physiopathologiques des complications cardiovasculaires et nous préciserons ensuite, les processus spécifiques de l'IRC.

III. Structure de la paroi artérielle normale

Au cours de l'IRC, la paroi vasculaire subit des modifications importantes, conduisant à une rigidité et une accumulation de lipides au sein de celle-ci. Ces modifications sont dues à un remodelage de la paroi, appelé la vasculopathie urémique.

1. Généralités

Le système vasculaire est complexe, compartimenté, hiérarchisé et non homogène. Il permet l'apport d'oxygène et de nutriment depuis la sortie du cœur vers les artères, les artéries et capillaires, ainsi que le retour veineux.

La paroi artérielle est organisée en trois tuniques concentriques avec, de la lumière à la périphérie : l'intima, la média et l'aventice. Des lames élastiques délimitent chaque tunique entre elles : la limitante élastique interne qui sépare l'intima de la média et la limitante élastique externe qui sépare la média de l'aventice (Figure 2).

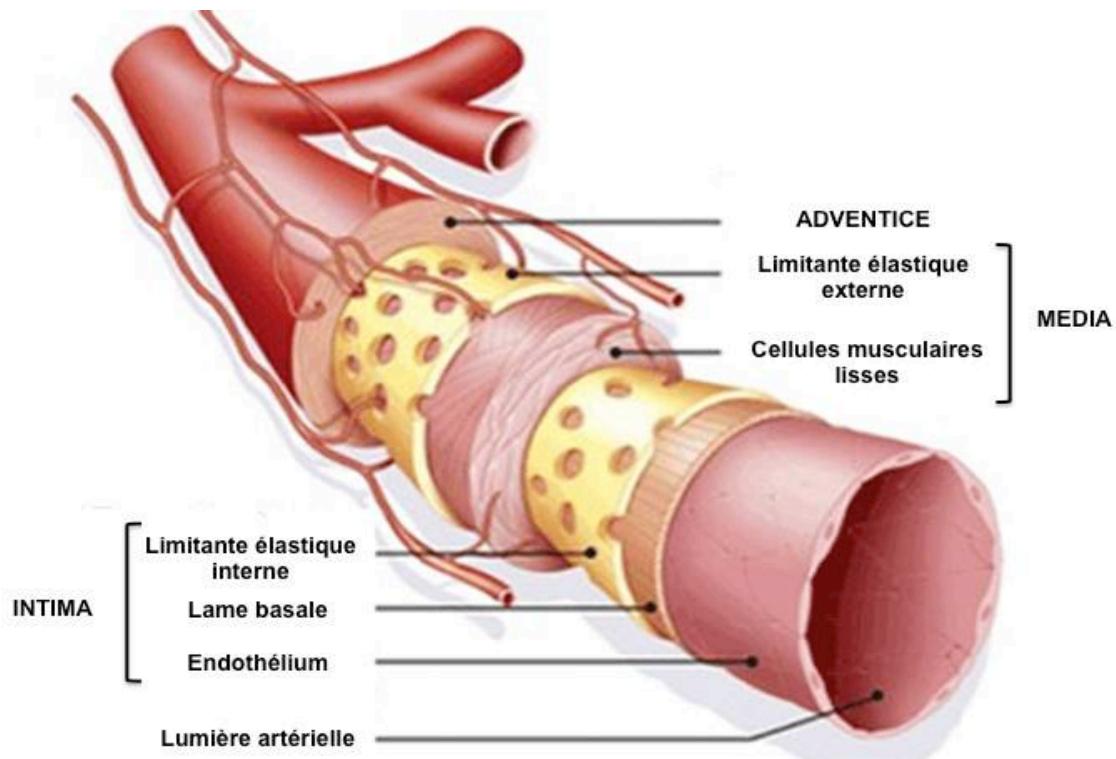


Figure 2 : Représentation schématique des différentes couches de la paroi vasculaire artérielle.

La paroi artérielle est composée de trois couches anatomiques : l'intima, formée d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur de la matrice extracellulaire (MEC) sous endothéiale ; la média, formée de cellules musculaires lisses entrelacées de MEC ; l'aventice, formée de tissus conjonctifs et de fibroblastes. La média est séparée par les limitantes élastiques interne et externe.

2. Cellules de la paroi

2.1. Intima

L'intima est la tunique la plus interne de la paroi vasculaire, elle est tapissée d'une monocouche de cellules endothéliales, reposant sur une matrice extracellulaire (MEC) [10]. L'endothélium vasculaire joue le rôle de barrière anatomique entre le sang circulant et les cellules musculaires lisses, mais également, il joue un rôle essentiel dans diverses régulations physiologiques fondamentales, comme l'hémostase, le contrôle du tonus musculaire, la régulation de l'inflammation *via* son interaction avec les cellules circulantes (Figure 3) [11], [12]. En effet, les cellules endothéliales sont recouvertes d'un glycocalyx dont le rôle majeur est d'empêcher l'agrégation plaquettaire sur la surface endothéliale. Elle joue également un rôle mécano-senseur, en contrôlant le tonus vasculaire *via* la libération de monoxyde d'azote (NO) ou la prostacycline (PGI_2) [13]. En cas de lésion vasculaire, les cellules endothéliales disposent de vésicules d'exocytose appelées corps de Weibel-Palade, qui sont des granules de sécrétion où sont stockées le facteur von-Willebrand, la P-selectine et différentes cytokines dans le but de réparer la lésion [14].

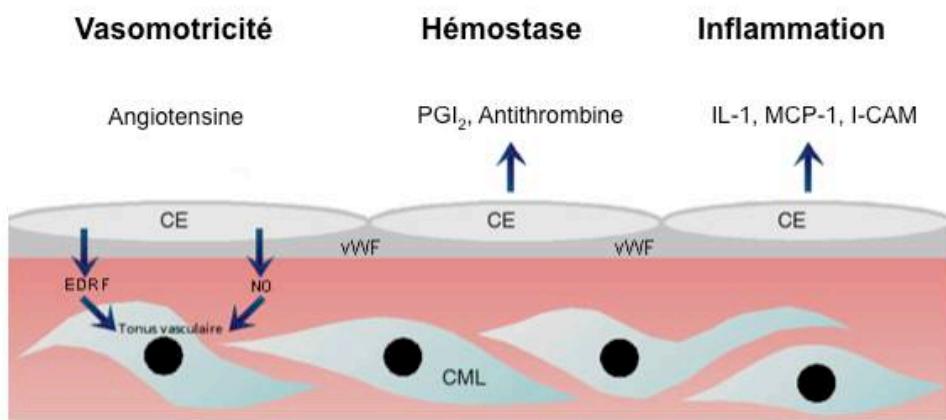


Figure 3 : Représentation schématique du rôle de l'endothélium vasculaire.

2.2. Media

La média est la tunique la plus épaisse de la paroi artérielle à l'état normal. Elle est essentiellement constituée d'un seul type cellulaire, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv).

Dans les artères de conductance (élastique), de gros calibre, où la MEC joue un rôle important, la média assure la compliance de l'artère. Elle a la capacité de se déformer sous l'effet de l'onde systolique et de reprendre sa forme initiale pendant la diastole tout en opposant une très faible résistance au débit sanguin et assurant un rôle hydraulique. Dans ces artères, une lame élastique interne sépare la média de l'intima et une lame élastique externe sépare la média de l'aventice. Entre ces limitantes, se forme des unités lamellaires composées d'élastine, de fibres de collagènes et de fines couches de MEC riches en protéoglycannes, dans lesquelles s'insèrent les cellules musculaires lisses.

Dans les artères de résistance (musculaire), de moyen et petit calibre, les unités lamellaires élastiques sont plus rares et plus fines ou parfois même fragmentées. Ces artères distribuent le sang en volume et pression adéquats aux niveaux des capillaires des différents organes, participant ainsi à la régulation physiologique de la résistance périphérique pré-capillaire.

Les CMLv sont indispensables pour la relaxation et la contraction des artères. En effet, ces cellules ont un phénotype contractile et prolifèrent peu à l'état normal avec un cytoplasme chargé de myofilaments. Les cellules musculaires lisses sont ancrées à la MEC qui les entoure, grâce à des protéines d'adhésion. Dans certaines conditions pathologiques, les CMLv peuvent avoir un changement de phénotype appelé « Switch phénotypique ». Sous l'influence de molécules circulantes, de facteur mécanique tel que l'augmentation de la pression artérielle ou la dégradation de la matrice extracellulaire, les CMLv adoptent un phénotype prolifératif, migratoire et synthétique. Ce changement phénotypique est caractérisé par la perte de marqueurs contractiles des CMLv.

2.3. Adventice

L'adventice est la couche périphérique de la paroi artérielle. L'épaisseur de l'adventice est extrêmement variable selon les territoires artériels. Elle est constituée de collagène fibrillaire et de fibres élastiques orientées aléatoirement. Cette matrice est sécrétée par les fibroblastes. Dans cette tunique, des nervi-vasorums sont retrouvés permettant ainsi l'innervation des vaisseaux mais également des vasa-vasorums. Ces derniers forment un réseau de capillaires assurant la nutrition des cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau, puisque les apports en oxygène et en nutriments de l'intima et des deux tiers de la média se font directement par la diffusion des éléments du sang circulant. Lors de phénomènes pathologiques d'épaississement de la paroi artérielle, et en particulier de l'intima, il y a une néogénèse vasculaire avec pénétration des vasa-vasorums dans la média et l'intima.

3. Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un composant non-cellulaire présent dans tout l'organisme. Elle est composée de macromolécules extracellulaires telles que des protéoglycannes, des glycoprotéines et protéines fibrillaires dont les principales sont les fibres de collagène et les fibres élastiques. Au sein de la MEC, ces protéines fibrillaires assurent la résistance aux tensions, alors que les protéoglycannes et les glycoprotéines s'organisent en un réseau relâché permettant de résister aux forces de compression [15]. Selon les tissus, la composition et l'organisation hétérogène de la MEC, guide les propriétés mécaniques de ces tissus.

Ces propriétés sont importantes au niveau des gros troncs artériels dont les contraintes dues à la pression artérielle sont fortes. En effet, la MEC fournit à la paroi vasculaire la structure de soutien et les propriétés d'élasticité et de résistance à l'étirement.

Dans la paroi des vaisseaux, ce sont principalement les CMLv qui synthétisent la matrice extracellulaire. Cette MEC forme un réseau tridimensionnel servant de support aux cellules, et représente plus de la moitié de la masse de la paroi vasculaire dans les artères élastiques.

3.1. Collagènes

3.1.1 Généralités

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes de l'organisme, ils représentent environ 30% de la masse totale des protéines. La superfamille des collagènes comporte 28 types de collagènes, numérotés de I à XXVIII. La caractéristique structurale commune des collagènes est la présence d'une triple hélice contenue dans leur structure, pouvant aller de 96% pour le collagène de type I à moins de 10% pour le collagène XII [16]. Cette structure résulte de l'association de trois chaînes polypeptidiques dont les séquences d'acides aminés présentent une répétition de triplets Gly-X-Y, où X et Y sont souvent la proline et l'hydroxyproline respectivement. Ces prolines et hydroxyproline induisent la conformation en hélice gauche de chacune des trois chaînes, qui s'assemblent spontanément pour former la triple hélice droite du collagène.

Les collagènes peuvent être subdivisés en sous-familles en fonction de leur structure et de leurs organisations supramoléculaires, ils peuvent être regroupés : en collagènes fibrillaires, collagènes associés à des fibrilles (FACIT), collagènes d'ancre, collagènes de réseau, collagènes transmembranaires, collagènes des membranes basales et les autres collagènes. Les différents types de collagènes se caractérisent par une complexité et une diversité structurelle, un épissage alternatif, par la présence de domaines supplémentaires non hélicoïdaux, par leur assemblage et par leur fonction. La famille de collagène la plus abondante et répandue avec environ 90% du collagène total est représentée par les collagènes formant des fibrilles [17].

Dans la paroi des vaisseaux, on retrouve des collagènes fibrillaires I, III et V, non fibrillaires IV et VI, et FACIT XII et XIV. Les collagènes fibrillaires I et III sont les plus abondants de la paroi, ces collagènes seront décrits dans les parties suivantes. Ils représentent environ 60% et 30% respectivement, des collagènes de la paroi. Ils ont pour rôle de structurer la paroi des vaisseaux [10], [16].

3.1.2 Collagènes fibrillaires

Les collagènes de types I, III et V sont des collagènes formant des fibrilles, les types I et III sont principalement responsables de la résistance à la paroi du vaisseau. La répartition des collagènes de types I et III varie fortement en fonction de la région vasculaire [18]. Au niveau de l'aorte ascendante, ces collagènes sont retrouvés dans les médias et l'aventice. Dans l'aorte thoracique descendante et dans les artères musculaires, le collagène de type I est principalement situé au niveau de la média et moins dans l'aventice, alors que le collagène de type III est localisé principalement dans l'aventice. Le collagène de type V joue un rôle essentiel dans la nucléation de la fibrille de collagène. La déficience en collagène de type V est létale au stade embryonnaire, chez les souris [19].

L'ARNm de ces collagènes sont traduits en une molécule de préprocollagène formée de 3 chaînes α , avec à chaque extrémité un propeptide. Après l'élimination du peptide signal dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER), le procollagène subit plusieurs étapes de modifications post-traductionnelles. L'hydroxylation des résidus de proline et de lysine est catalysée par la prolyl-3-hydroxylase, la prolyl-4-hydroxylase et la lysyl-hydroxylase. Ces liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires ainsi formées, sont indispensables à la stabilisation de la structure du collagène. De plus, ces résidus d'hydrolyse sont capables de fixer des glucides. Cette glycosylation est sous l'action de deux enzymes : la galactosyl-transférase et la glycosylgalactosyl-transférase. Après l'assemblage et l'enroulement des trois chaînes α , le procollagène est ensuite sécrété dans le compartiment extracellulaire où les propeptides vont être clivés. Les molécules de collagène matures s'assemblent parallèlement les unes aux autres, formant les fibrilles de collagène. Cette structure est maintenue par des liaisons faibles inter chaînes, stabilisées par la formation de pontages par la lysyl-oxydase et s'associe à d'autres protéines comme les protéoglycannes afin de former la fibre de collagène (Figure 4).

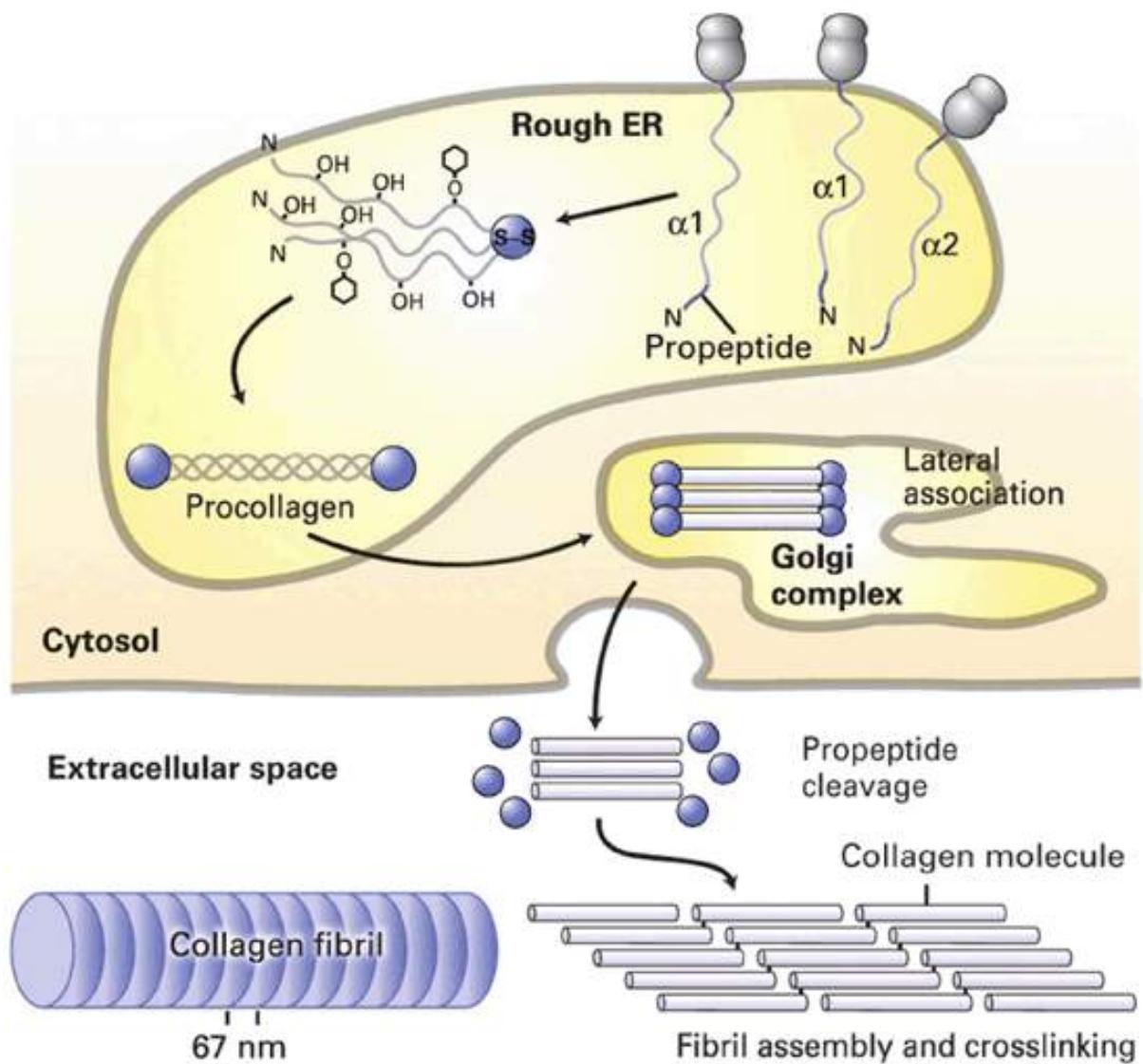


Figure 4 : Représentation schématique de la synthèse de collagène de type I.

Suite à leur traduction, les chaînes α subissent des modifications post-traductionnelles, puis elles s'associent en molécule de procollagène et continuent leur maturation dans le Golgi. Suite à leur sécrétion, les propeptides sont clivés, formant la molécule de collagène mature. Les molécules s'assemblent entre elles et forment des fibrilles de collagène stabilisées par des liaisons croisées. Plusieurs fibrilles vont s'assembler et former la fibre de collagène.

3.2. Fibres élastiques

3.2.1 Généralités

L'élastine est l'une des protéines majoritairement présente au sein de la matrice extracellulaire, elle est responsable de l'élasticité des tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques comme dans la peau, les poumons ou les vaisseaux sanguins. Au cours de l'évolution, l'apparition de l'élastine coïncide avec la formation d'un système vasculaire clos, permettant l'adaptation à la pression artérielle.

L'élastine représente 90% des protéines des fibres élastiques, les 10% correspondent aux microfibrilles associées à l'élastine. Cette dernière est composée de protéoglycannes tels que le biglycanne et la décorine, et de glycoprotéines de structures : les fibrilines et MAGP (*Microfibril Associated GlycoProtein*) [20].

La fonction élastique des vaisseaux est assurée par la présence des fibres élastiques qui sont organisées en lames concentriques, parallèles à la surface des vaisseaux.

3.2.2 Elastogénèse

L'élastine est une protéine insoluble et hydrophobe, elle est synthétisée, par les CMLv, les fibroblastes et les cellules endothéliales, sous la forme de précurseur soluble, la tropoélastine. La synthèse de l'élastine débute au cours du développement fœtal jusqu'à la période prénatale [21]. Après la naissance, la synthèse de l'élastine est ralentie jusqu'à la puberté. Chez l'adulte sa synthèse est quasi nulle [22].

L'expression de la tropoélastine est sous le contrôle du gène ELN, localisé sur le chromosome 7, constitué de 34 exons [23].

Les exons de la tropoélastine codent successivement pour des séquences hydrophobes et des régions hydrophiles. Les régions hydrophobes sont riches en motif répétitif contenant des acides aminés apolaires tels que la proline, la valine, lalanine, la leucine ou la glycine [24]. Les interactions hydrophobes que ces régions forment sont responsables des propriétés élastiques de l'élastine [25]. Les régions hydrophiles sont principalement constituées de lysine et d'alanine, impliquées dans les pontages intra- et inter-chaînes, ciblées par la lysyl-oxydase.

L'ARNm de la tropoélastine est traduit dans le RER, formant une protéine d'environ 70 kDa avec une séquence signal de 26 acides aminés qui est clivée dans la lumière du RER. Ensuite, la tropoélastine est associée à une protéine chaperonne, l'EBP

(*Elastin Binding Protein*), afin d'empêcher une agrégation intracellulaire anarchique et une dégradation de celle-ci [26], [27]. Cet assemblage de l'EBP et de la tropoélastine est dirigé vers la membrane plasmique, pour ensuite être sécrété dans le milieu extracellulaire. L'EBP va alors se lier avec des galactosides présents sur des structures annexes, les microfibrilles. Cette liaison entraîne une libération locale de la tropoélastine, qui est ensuite alignée et incorporée dans la fibre élastique croissante grâce aux microfibrilles [28]. Cette association est appelée coacervation, et permet la formation d'un gel dépendant de la température, du pH ainsi que de la concentration en monomères [29], [30]. Après la libération de la tropoélastine, l'EBP est recyclé par les cellules [31].

Sous l'effet de la lysyl-oxydase, les résidus de lysine en position $\text{NH}_2-\epsilon$ de la tropoélastine sont désaminés, et forment des allysines. Les allysines et les lysines sont des précurseurs à l'origine de la formation des liaisons croisées. Ces deux résidus, présents au sein d'un même monomère ou entre différents monomères de tropoélastine, vont interagir entre eux et former deux intermédiaires de condensation : l'allysine aldol et la lysinonorleucine. Les interactions entre ces intermédiaires de condensation, les lysines et les allysines forment des produits finaux de liaisons croisées, la desmosine et l'indesmosine. Ces produits finaux sont des structures typiques de l'élastine, et sont de bons marqueurs de la dégradation de l'élastine [32]. Il en résulte une polymérisation irréversible des monomères de tropoélastine rendant l'élastine insoluble et stable [33].

3.2.3 Architecture

Les fibres élastiques sont des assemblages macromoléculaires complexes constituées d'une couche de microfibrilles riche en fibrilline entourant un cœur d'élastine [34]. L'architecture des fibres élastiques matures est complexe et spécifique aux tissus, reflétant les fonctions particulières qu'elles ont dans les tissus. L'élastine est un polymère hautement hydrophobe de monomère de tropoélastine réticulée. Les microfibrilles sont formées de glycoprotéines.

Ces microfibrilles sont les premiers composants formés de la MEC, elles apparaissent avant l'élastine, et se comportent comme une ossature permettant le dépôt, l'orientation et l'assemblage de la tropoélastine monomérique. Plusieurs monomères de fibrilin 1 et 2 s'associent pour former la structure de base de la microfibrille avant de fixer d'autres

glycoprotéines telles que les MAGP qui vont stabiliser la structure, créant des ponts disulfures et des points d'ancrage à l'élastine (Figure 5) [35], [36].

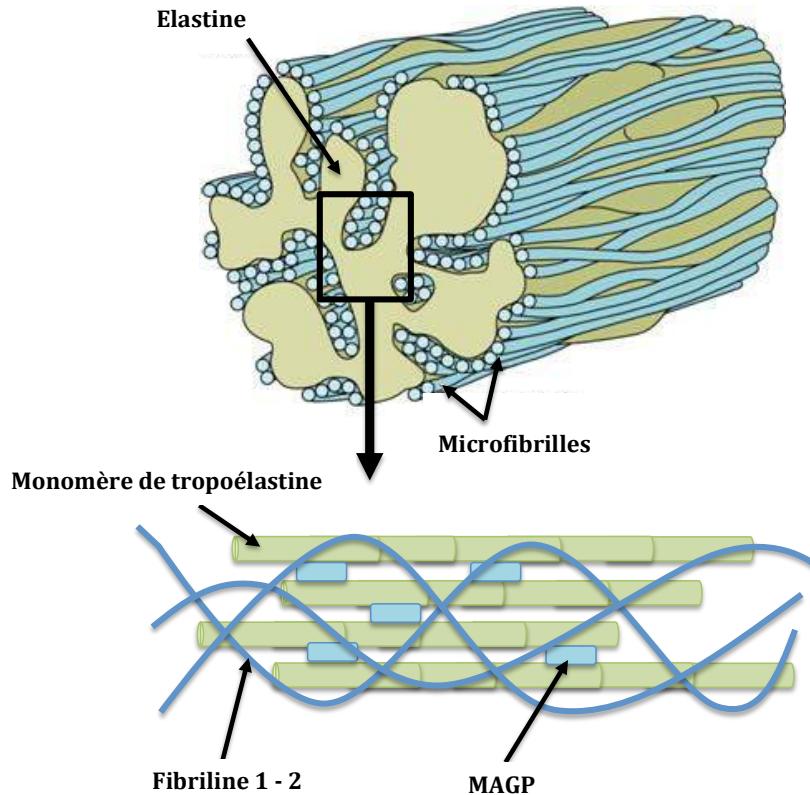


Figure 5 : Représentation schématique d'une fibre élastique.

Adapté d'après Gartner et al., 2006 [37]

3.2.4 Dégradation

L'élastine est l'une des protéines de l'organisme à avoir une durée de vie longue. En effet la demi-vie de l'élastine est estimée à 70 ans, elle a un très faible taux de renouvellement et est très résistante aux dégradations protéolytiques [38].

Dans certaines conditions vasculaires pathologiques, un processus inflammatoire important est retrouvé, provoquant la dégradation de l'élastine [39]. Ce processus inflammatoire fait intervenir des enzymes spécifiques pouvant dégrader l'élastine, les élastases. Ces enzymes comprennent les séries-, cystéines-, et métallo-protéases. Parmi les séries protéases on retrouve : les neutrophiles élastase, la cathepsine G et la

protéinase-3 libérées par les PNN (*PolyNucléaires Neutrophiles*) [40] et les CMLv. Plusieurs cystéine-protéases de la famille des cathepsines (cathepsine L, S, K et V) ont également une activité élastinolytique et sont produites par les macrophages et les CMLv. Les métallo-protéases matricielles (MMP) telles que les MMP-2 (gélatinase A) -7 (matrilysine), -9 (gélatinase B) et -12 (élastase du macrophage) dégradent aussi l'élastine [41].

4. Protéoglycannes

Les protéoglycannes (PG) sont des macromolécules complexes de grandes tailles. Ils sont constitués de chaînes polypeptidiques sur lesquelles sont liées de façon covalente des glycosaminoglycanes (GAG). Ces GAGs sont formés des chaînes polyosidiques non ramifiées composées de résidus osidiques. Les PG occupent en grande partie l'espace extracellulaire sous la forme d'un gel hydraté [42]. Ils sont classés selon la longueur de leur chaîne polypeptidique, de leur localisation tissulaire et de leur composition en GAG. Les variations de la composition en GAG et de la chaîne polypeptidique sont à l'origine de fonctions biologiques très variées [43], [44]. Les chaînes de GAG participent à l'hydratation de la MEC, en effet ces molécules sont fortement hydrophiles grâce à leurs fonctions acides. Cette structure hydratée à la propriété d'être d'une grande viscosité, ce qui lui permet assurer une résistance face aux forces de compression.

Les PG assurent également une fonction essentielle qui est de fixer des cytokines ou des facteurs de croissances, permettant leur stockage temporaire et le contrôle de leur activité [45], [46].

Au niveau vasculaire, les PG interviennent dans la fixation des cellules vasculaires à la matrice environnante, le contrôle de la coagulation et permettent l'attachement des enzymes du métabolisme lipidique [46].

5. Les glycoprotéines de structure

Les glycoprotéines de la MEC sont des protéines liées de façon covalente à un ou plusieurs groupements glucidiques. Elle représente une part minoritaire par rapport aux autres composants de la MEC mais jouent un rôle essentiel. Leurs fonctions sont extrêmement variées, elles peuvent s'associer à d'autres protéines de la MEC ou encore médier les interactions entre les cellules et la MEC *via* des récepteurs spécifiques, comme les intégrines. Cette interaction cellule/matrice permet l'adhésion cellulaire, la migration, la croissance, la différenciation, ainsi que la survie des cellules adhérentes [10].

Les principales glycoprotéines de structure de la MEC vasculaire sont les fibronectines, les laminines, les thrombospondines, les ténacines et l'ostéopontine. Les fibronectines permettent l'adhérence des cellules vasculaires lors de la formation des vaisseaux, et se lient aux plaquettes et monocytes *via* les intégrines. Les laminines participent à la formation de la lame basale, servant de support aux cellules endothéliales. L'ostéopontine (OPN) est faiblement exprimée chez les personnes saines, mais l'expression de l'OPN est fortement activée en cas d'inflammation par les monocytes/macrophages et les CMLv. Elle participe aux calcifications vasculaires au niveau des lésions athérosclérotiques avancées [10], [47], [48].

L'insuffisance rénale chronique induit des modifications importantes de la structure et de la composition de la MEC. En effet, une dégradation importante de l'élastine est observée à des stades précoces de l'IRC, induisant une diminution de la compliance des vaisseaux. De plus, les peptides d'élastine formés au cours de cette dégradation participent à l'inflammation de la paroi artérielle, ils ont également une forte affinité pour le calcium, facilitant la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite. La présence de protéines matricielles osseuses est également retrouvée au niveau de la paroi vasculaire des patients urémiques telles que l'ostéopontine, l'ostéonectine, le collagène de type I parallèlement à la diminution de la « Matrix Gla protein ». Ces modifications participent au remodelage de la paroi vasculaire urémique [65]–[67].

IV. Physiopathologie du remodelage de la paroi vasculaire

La détérioration progressive de la structure de la paroi vasculaire à un rôle important dans l'apparition des complications vasculaires liées à la modification de celle-ci.

1. Athérosclérose

1.1. Classification

Les accidents ischémiques aigus sont, dans la majorité des cas, la conséquence de la formation de plaque d'athérosclérose et des complications engendrées par celles-ci.

En 1995, l'American Heart Association (AHA) a proposé une classification des lésions athéromateuses plus détaillée, basée sur les données histologiques et structurales des plaques [52]. Cette classification suggère que les lésions évoluent avec l'âge du sujet en passant successivement d'un stade lésionnel au type supérieur (Tableau 2).

Lésions de type I: elles sont caractérisées par la présence de cellules spumeuses qui résulte de l'accumulation de lipides dans le cytoplasme des macrophages situés dans l'espace sous endothérial.

Lésions de type II: elles sont caractérisées par une accumulation importante des cellules spumeuses, s'organisant en petits amas au niveau de la couche sous-endothéliale. Ces amas sont visibles macroscopiquement et forment des lésions jaunâtres, allongées parallèlement au flux sanguin : les stries lipidiques. Elles sont principalement retrouvées au niveau de l'aorte thoracique.

Lésions de types III: elles sont intermédiaires entre les lésions de type II et de type IV et correspondent à la plaque d'athérome mature. En plus des caractéristiques de lésions de type II, il y a également l'accumulation de lipides extracellulaires sous les cellules spumeuses, désorganisant les CMLv.

Lésion de types IV: il s'agit du premier type de lésions dites « avancées ». En effet elles sont caractérisées par la présence d'un « cœur lipidique » au sein de la paroi due à la confluence de dépôts lipidiques extracellulaires. Ce centre lipidique également appelé centre athéromateux est pauvre en cellules, seuls quelques macrophages ou cellules spumeuses géantes y résident entourés de cristaux de cholestérol. A ce stade, il a été observé un épaissement de la paroi artérielle sans modification du diamètre de la lumière artérielle.

Les lésions peuvent évoluer de manière différente à partir de ce stade, soit en plaque fibreuse (type V) ou devenir thrombotiques ou compliquées (type VI) sans forcément passer par une plaque de type V.

Lésions de types V: la plaque fibrolipidique ou fibro-athérome, est constituée schématiquement d'un centre lipidique entouré d'une chape fibreuse. Le centre lipidique est constitué de cellules spumeuses, de lipides extracellulaires sous forme de cristaux de cholestérol, et présente un aspect nécrotique. Dans ce centre lipidique il est retrouvé principalement des macrophages et peu de CMLv (environ 20%) [53].

La chape fibreuse qui entoure le centre lipidique est constituée de matrice extracellulaire abondante comprenant essentiellement des collagènes fibrillaires de type I et III et des glycoprotéines. Au niveau de la chape fibreuse, les principales cellules retrouvées sont les CMLv (environ 70%), ce sont elles qui sécrètent la MEC. 30% des cellules restantes sont des macrophages ou d'autres cellules inflammatoires, la variation de la densité cellulaire entre les cellules inflammatoires et les CMLv détermine le phénotype stable ou non stable de la plaque d'athérome [54].

Dans ce type de lésion, il a également été observé la présence, au niveau du corps lipidique, de calcifications dues à l'accumulation de calcium par les corps apoptotiques des macrophages. Les calcifications vasculaires seront décrites en détail dans l'un des paragraphes suivants.

Cliniquement les lésions de types V engendrent des sténoses des artères, en effet la progression du centre lipidique et la formation de la chape fibreuse réduisent la lumière artérielle. Au niveau aortique, ces sténoses ne sont pas suffisamment volumineuses pour induire un arrêt du flux sanguin, cependant dans les artères de plus petits calibres telles que les coronaires ou les carotides, le volume occupé par la plaque d'athérome peut entraîner des manifestations cliniques.

Lésions de types VI: Il s'agit de la plaque d'athérome dite « compliquée », puisque leur apparition n'est pas corrélée au volume de la plaque, mais à des phénomènes hémorragiques ou thrombotiques intraplaques. La cicatrisation de ces phénomènes permet de revenir à une lésion de type V, mais contribue également à la progression de la sténose par augmentation du volume de la plaque. La survenue de complications est le processus physiopathologique pouvant rendre une plaque brutalement symptomatique.

Les accidents aigus tels que l'angor instable ou l'infarctus du myocarde sont liés à des plaques d'athérome compliquées.

Les lésions de type VI sont divisées en 3 sous types :

- Le type VIa (ulcération) : la rupture de la plaque est caractérisée par une perte de matière issue du centre lipidique, formant une dépression au niveau de la chape fibreuse.
- Le type VIb (hémorragie/hématome intraplaque) : cette complication correspond à la capture de sang à l'intérieur du centre lipidique.
- Le type VIc (thrombose) : la thrombose peut être occlusive dans les artères de petits et moyens calibres ou non occlusive laissant une lumière proche du thrombus. Le thrombus apparaît macroscopiquement comme un matériel noirâtre tapissant l'ulcération. Il peut être réorganisé en thrombus fibrinocrurotique, la fibrine et les cellules du caillot sont dégradées par les macrophages. Les CMLv vont alors migrer autour du thrombus tout en sécrétant de la MEC, permettant la stabilisation de celui-ci.

Tableau 2 : Classification des lésions de l'athérosclérose, adaptée d'après Stary [52]

Type de lésion	Nom	Progression	Age	Clinique
I	Macrophages spumeux isolés	<p>The diagram illustrates the sequential stages of plaque development:</p> <ul style="list-style-type: none"> Step 1: Isolated macrophages (Macrophages isolés) are shown in the intima layer. Step 2: Macrophages and foam cells (Macrophages et cellules spumeuses) accumulate in the intima. Step 3: Extracellular lipids (Lipides extracellulaires) are deposited. Step 4: A lipid-rich core (Corps lipidique) forms. Step 5: A fibrous cap (Chape fibreuse) begins to form over the core. Step 6: A complex plaque is formed, containing a thrombus and hemorrhage (Thrombus Hémorragie). 	Naissance	Aucun Symptôme
II	Strie lipidique		10 ans	
III	Pré-athérome		20 ans	
IV	Athérome		30 ans	
V	Plaque fibreuse		< 40 ans	
VI	Plaque compliquée			Avec Symptômes

1.2. L'athérogenèse

Les cellules endothéliales sont les premières cellules de la paroi vasculaire à être impliquées dans le processus d'athérogenèse. En effet, la dysfonction endothéliale (DE) est l'étape principale et cruciale du développement de l'athérosclérose. Cette DE est retrouvée principalement au niveau des zones de bifurcation ou de changement du diamètre vasculaire, créant ainsi des perturbations du flux sanguin modifiant les forces de cisaillement au niveau des cellules endothéliales (Figure 6) [55]. En effet, les forces de frottement sont retrouvées plus faibles voire négatives dans ces régions, induisant une perméabilité trans-endothéliale, permettant ainsi l'entrée des LDL au niveau de l'espace sous endothérial [56], [57]. Ces cisaillements induisent également l'activation des cellules endothéliales via la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que l'expression de molécules d'adhésion permettant le recrutement des monocytes circulants. Il y a également une augmentation de l'expression de molécules pro-thrombotiques et pro-inflammatoires [58], [59].

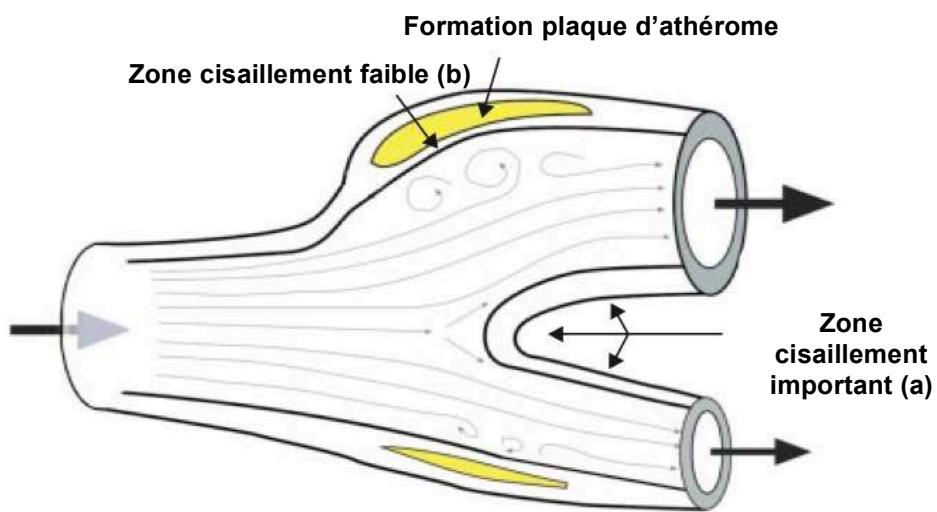


Figure 6 : Représentation schématique des forces de cisaillement liées à la formation de plaque d'athérome.

(a) zone de cisaillement importante « protégée » de l'apparition de plaque d'athérome, (b) zone de cisaillement faible, induisant une dysfonction endothéliale et la formation de plaque d'athérome. (d'après Malek, [55])

Suite à leur pénétration et leur rétention médiée par les protéoglycannes ou les GAG de la MEC ainsi que l'interaction avec l'apoprotéines B100 [60], les LDL s'accumulent dans l'espace sous endothérial, induisant un processus d'oxydation progressif qui conduit à la génération de LDL oxydés à divers degrés (faiblement et fortement oxydés). Cette oxydation est favorisée par le stress oxydant généré par les cellules de la paroi artérielle et les cellules inflammatoires, mais également favorisée par l'action de certaines enzymes telles que la 15-lipoxygénase (Figure 7) [61], [62], [63].

Les LDL-oxydés ont un pouvoir chimioattractant sur les monocytes et favorisent leur différenciation en macrophages résidants. Elles induisent également l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, telles que VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule) ou des molécules de surface de la famille des sélectines (L-, P- et E sélectines), permettant l'adhésion et l'extravasation des monocytes [64], [65]. De plus, d'autres facteurs chimiotactiques sont synthétisés par les macrophages suite à leur entrée au niveau de l'espace sous endothérial, dont le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), ce qui contribue à un rétrocontrôle positif de l'entrée des monocytes [66]. Les macrophages ont tout d'abord un rôle bénéfique dans l'épuration du cholestérol de l'intima mais, en revanche, ils participent au processus d'amplification de l'athérogenèse *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, favorisant la perméabilité endothéliale aux LDL. De plus, en se chargeant en lipides, ils se transforment en cellules spumeuses.

L'internalisation des LDL modifiée par les macrophages se fait par l'intermédiaire de récepteurs scavengers. La captation des LDL oxydés n'est pas contrôlée négativement par des inhibiteurs, et les macrophages peuvent capter une grande quantité de cholestérol, se transformant alors en cellules spumeuses qui vont s'accumuler au niveau de la paroi artérielle [67], [68], [69]. Il a également été montré qu'environ 50% des macrophages transformés en cellules spumeuses expriment également des marqueurs de CMLv [70], résultant d'une transdifférenciation des CMLv en cellules macrophagiques spumeuses [71]. Au niveau des stries lipidiques, les lipides sont principalement intracellulaires *via* le stockage par les macrophages. Puis, lorsque la capacité d'épuration n'est plus suffisante, il y une accumulation de lipides au centre de la plaque, formant le cœur lipidique, composé de cristaux de cholestérol et de débris cellulaires [10].

Les cellules musculaires lisses vont ensuite migrer de la média vers l'intima, sous l'influence des stimuli athérogènes. Elles vont alors proliférer dans l'espace sous endothérial et entourer le cœur lipidique. Un changement phénotypique des CMLv est alors observé, passant d'un phénotype contractile à un phénotype sécrétoire. Ces CMLv perdant leur marqueurs moléculaires impliqués dans les fonctions contractiles tels que la chaîne légère de myosine, ou l'α-actine et sont capables de synthétiser des molécules de la MEC, des protéases et des cytokines [72]. La migration, la prolifération et la synthèse de la MEC par les CMLv vont permettre la formation de la chape fibreuse recouvrant le cœur lipidique [73].

Le développement de la plaque peut durer plusieurs décennies sans modifier le calibre vasculaire, la paroi artérielle est capable d'adapter et d'optimiser sa structure par rapport aux conditions imposées par la formation de la plaque. L'augmentation de la contrainte de cisaillement, due à l'augmentation de la plaque d'athérome, induit des modifications de la média et de l'aventice tendant à augmenter la surface délimitée par la limite élastique interne. Lorsque la surface de lumière est rétablie par cet élargissement, le remodelage expansif disparaît. La croissance de la plaque d'athérome se produit en parallèle de ce phénomène de remodelage, cependant ce mécanisme est rapidement dépassé. En effet, l'augmentation de la surface liminale connaît des limites, puisque les plaques occupant plus de 40% de cette surface ne sont plus compensées [74], [75].

Les manifestations cliniques graves de l'athérosclérose sont essentiellement dues à la formation d'un thrombus sur une plaque d'athérome instable. Le thrombus se développe au contact de la plaque obstruant la lumière artérielle due à l'exposition du matériel lipidique thrombogène au sang circulant. Ce phénomène sera détaillé plus précisément dans le paragraphe athérothrombose.

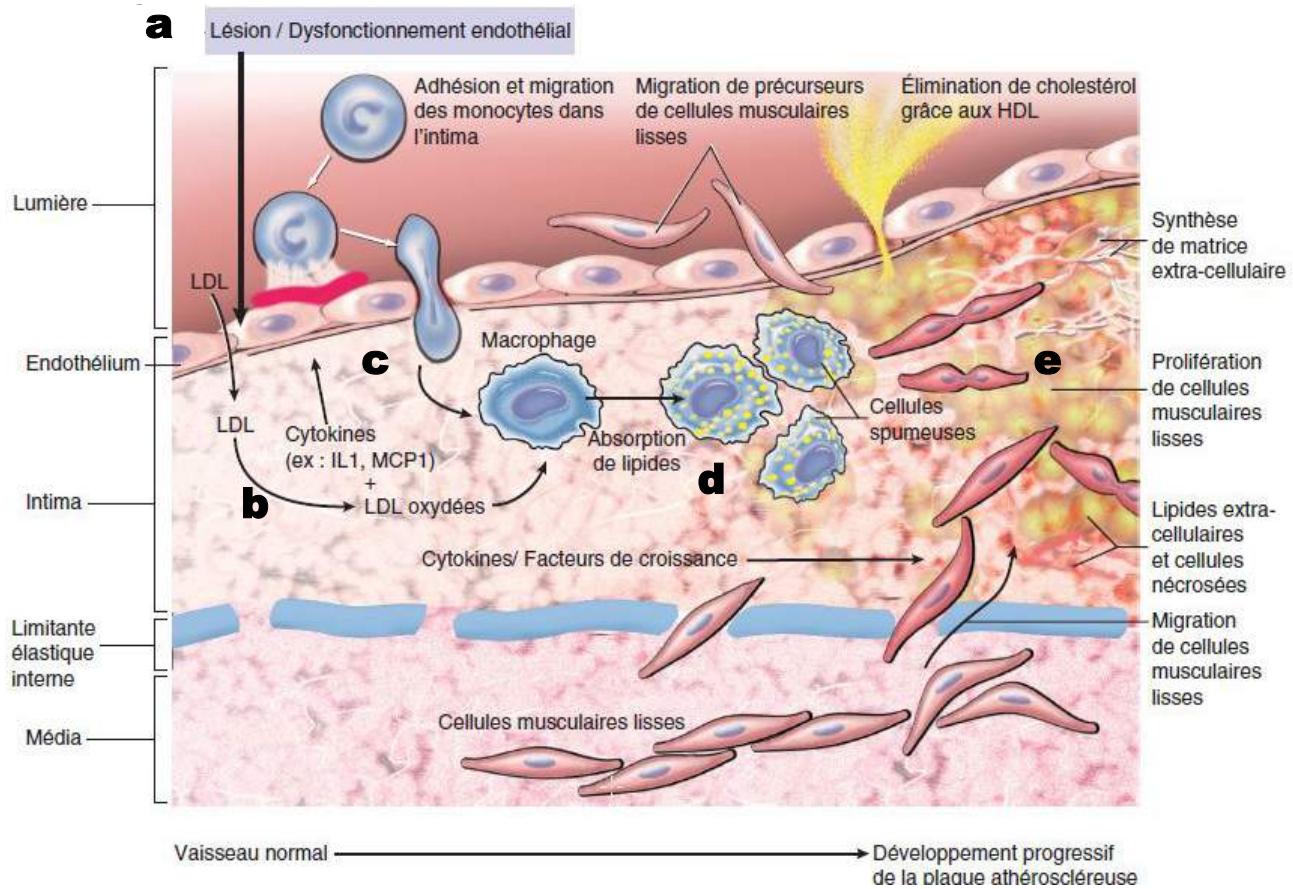


Figure 7 : Représentation schématique du développement de la plaque d'athérome.
(a) La dysfonction de l'endothélium induit une perméabilité de celui-ci aux LDLs, qui vont se fixer aux protéoglycans et être modifiés (b). (c) Recrutement de macrophages au sein de la paroi. (d) Transformation des macrophages en cellules spumeuses. (e) Migration, prolifération et sécrétion de MEC par les CMLv.

2. Athérothrombose

L'athérothrombose est caractérisée par érosion superficielle de l'endothélium ou une rupture de la plaque athéromateuse, suivie d'une activation plaquettaire et de la formation d'un thrombus. L'athérothrombose est une complication thrombotique de l'athérosclérose, formée par une instabilité de la plaque d'athérome.

2.1. Fissuration et rupture de la plaque

L'évènement initial entraînant la formation d'un thrombus au niveau d'une plaque d'athérome est la rupture (60 % des cas) ou l'érosion (40 % des cas) de la plaque, supprimant l'interface entre l'endothélium et le sang circulant (Figure 8).

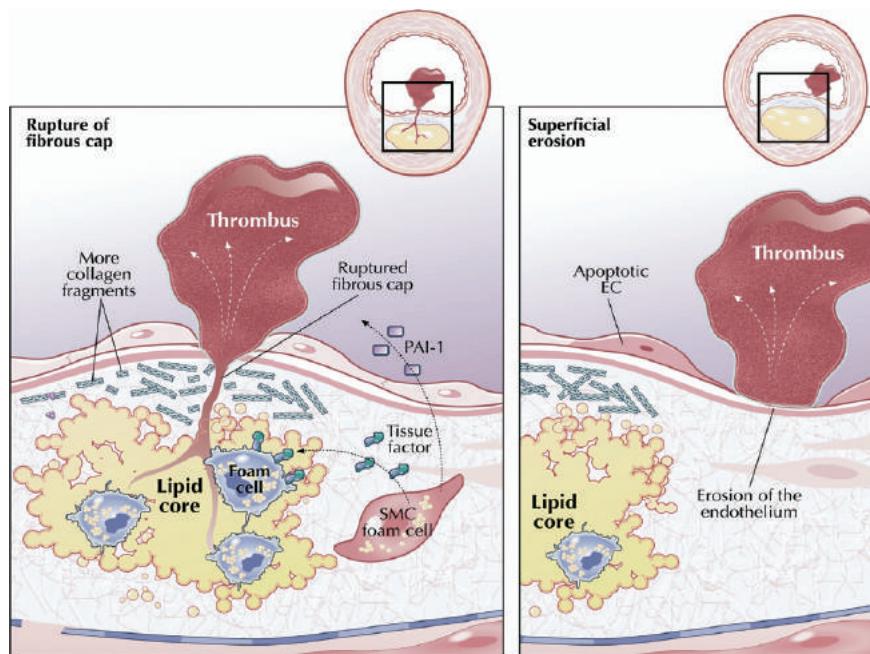


Figure 8 : Représentation schématique de la formation d'un thrombus artériel suite à la rupture (à gauche) ou l'érosion (à droite) de la plaque d'athérome.

La rupture de la plaque est essentiellement due à la fragilité de celle-ci (à gauche).

L'apoptose des cellules endothéliales intervient principalement dans l'érosion de la plaque d'athérome (à droite).

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la stabilité de la plaque d'athérome :

2.1.1 Facteurs extrinsèques

- Les forces physiques appliquées par le flux sanguin sur la plaque d'athérome, le plus souvent au niveau d'un amincissement de la chape fibreuse, induisent une vulnérabilité de la plaque. Une élévation transitoire importante peut ainsi fissurer voir rompre celle-ci [76].

2.1.2 Facteurs intrinsèques

- La présence d'un cœur lipidique occupant plus de 40% de la plaque d'athérome, augmente les contraintes physiques de celle-ci (Figure 9).

- La composition de la chape fibreuse intervient également, puisque plus elle est fibreuse et épaisse, plus la plaque est stable. Le point le plus faible se situe souvent à la marge de la chape, là où elle est la plus fine. Cet amincissement de la chape implique une balance entre inflammation et synthèse de la MEC au sein de celle-ci [77].

En effet, les CMLv synthétisent la MEC, qui participe à la formation d'une chape épaisse et stable. Cependant les plaques rompues contiennent beaucoup moins de CMLv et de collagène par rapport aux plaques non-rompues. Ces CMLv sont souvent absentes au niveau du site de rupture [78].

En effet, les plaques rompues sont essentiellement infiltrées par des cellules spumeuses, qui sécrètent des enzymes protéolytiques telles que des activateurs du plasminogène, des cathepsines ou des métalloprotéases matricielles telles que la MMP-2, MMP-3 et MMP-9 [79], [80], [81], [82]. Ces cellules inflammatoires synthétisent également des cytokines pro-inflammatoires pouvant d'une part stimuler l'activité de ces protéases, mais également inhiber la synthèse, par les CMLv et le collagène de type I et III.

- L'apoptose des cellules au sein de la plaque augmente la vulnérabilité et la thrombogénicité de celle-ci. Au niveau des cellules endothéliales, l'apoptose participe à l'érosion de l'endothélium et est à l'origine de la formation de thrombus muraux, principalement non occlusifs [83]. L'apoptose des cellules spumeuses et des CMLv, induit la libération de microparticules pro-thrombogènes riches en facteur tissulaire [84], [85].

Ces différents phénomènes induisent la fragilité de la plaque d'athérome.

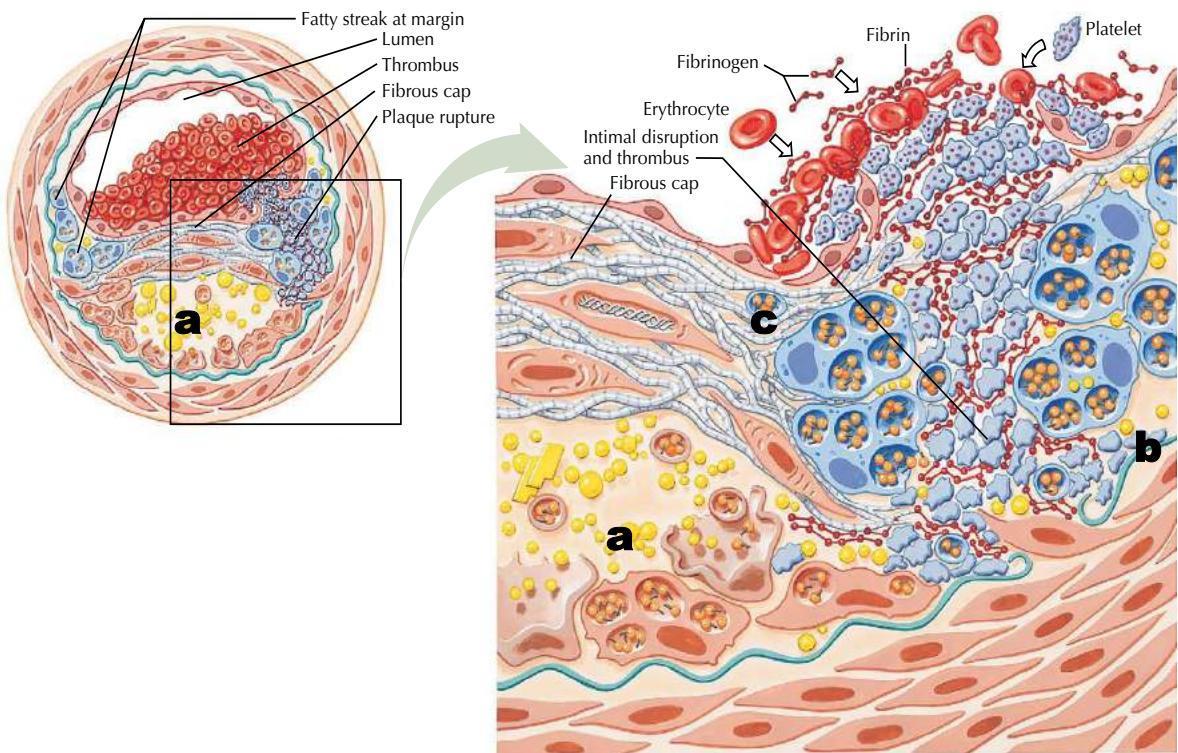


Figure 9 : Représentation schématique des différents facteurs intervenant dans la fragilité de la plaque d'athérome conduisant à la formation d'un thrombus.

(a) la présence importante d'un corps lipidique modifiant les forces appliquées par le flux sanguin, (b) l'apoptose des cellules spumeuses, (c) l'amincissement de la chape fibreuse au point de rupture.

2.2. La thrombose

La rupture d'une plaque vulnérable modifie la géométrie de celle-ci et déclenche un thrombus. Un changement rapide de la plaque peut entraîner une occlusion aigüe ou une sous-occlusion avec des manifestations cliniques. La perte de la barrière endothéliale thromborésistante, ainsi que l'exposition du substrat pro-thrombogène contenu dans le cœur lipidique induisent l'activation et l'agrégation des plaquettes sanguines et l'activation de la cascade de coagulation.

2.2.1 Thrombogénicité de la plaque

Il a été montré que le centre lipidique était environ 6 fois plus thrombogène que les autres composants de la plaque [86]. En effet, on y observe la présence de lipides extracellulaires, de cellules spumeuses ou inflammatoires et des débris cellulaires plus ou moins nécrotiques. L'activité pro-coagulante totale des plaques d'athérome est principalement due au facteur tissulaire [87].

Le facteur tissulaire (FT) est un récepteur cellulaire, impliqué dans la voie extrinsèque de la cascade de coagulation. Le FT induit l'activation en cascade du facteur VII et X permettant l'activation de la thrombine, aboutissant à la formation de monomère de fibrine [88]. La présence importante de FT a été montrée au sein des plaques d'athérome, au niveau des cellules spumeuses, mais également au niveau du cœur lipidique, dans les nodules nécrotiques [89]. De plus, l'expression de FT par les macrophages est modulée par les LDL oxydés, et l'activité de celui-ci dépend principalement de l'environnement [87]. En effet, l'activité du FT est fortement potentialisée par l'apoptose des cellules vasculaires ou inflammatoires. La formation de microparticules apoptotiques contenant le FT permet, d'une part, de former une surface d'exposition de la phosphatidylsérine membranaire indispensable à l'activité coagulante du FT, mais d'autre part, permet la dispersion du FT lors du largage du contenu de la plaque [87], [88], [90].

2.2.2 Rôle des plaquettes

Les plaquettes sont de petites cellules anucléées provenant de la fragmentation des mégacaryocytes, de taille moyenne de 2 à 5 μm . A l'état normal, environ deux tiers des plaquettes circulent dans le sang, l'autre tier est séquestré au niveau de la rate. Le taux de plaquettes circulantes varie entre 150 à $400.10^3 / \mu\text{L}$ et leur durée de vie est d'environ de 10 à 12 jours. Les plaquettes sont donc renouvelées quotidiennement avec environ 1.10^{11} plaquettes par jour, principalement sous le contrôle de la trombopoïétine (TPO) [91], [92], [93].

En s'activant, les plaquettes changent de forme, passant de la forme discoïde à une forme sphérique avec de longues extensions membranaires (Figure 10). De plus, la membrane plasmique plaquettaire contient des glycoprotéines transmembranaires interagissant avec le cytosquelette, facilitant l'adhésion des plaquettes au sous-

endothélium. Leur cytoplasme est riche en actine et myosine (l'actine représente 20 à 30% du contenu protéique total d'une plaquette), ce qui permet le changement de forme rapide des plaquettes et la rétraction du caillot [91], [94]. Lors de leur activation, plusieurs organelles plaquettaires sécrètent leur contenu. Il existe des granules sécrétoires et des lysozymes (Figure 11).

- Les granules denses sécrètent du calcium, de l'ADP, de l'adrénaline et de la 5-hydroxytryptamine (sérotonine), ce qui renforce l'agrégation plaquettaire [91].
- Les granules α sécrètent un grand nombre de protéines, certaines sont impliquées dans l'interaction des plaquettes entre elles ou avec le sous endothélium telles que le vWF (20% des protéines contenues dans les granules α), le fibrinogène endocyté à partir du plasma, mais également d'autres protéines plasmatiques comme l'albumine, les IgG, les protéines adhésives (thrombospondines) et les facteurs de croissance (PDGF). Les granules α libèrent également des facteurs de la coagulation et des cofacteurs participant à l'hémostase secondaire (facteur V, XI et XIII). Les membranes de ces granules contiennent des récepteurs d'adhésion plaquettaire comme le complexe récepteur au vWF (GPIb-IX-V), le récepteur au fibrinogène (GPIIbIIIa) et le récepteur au collagène (GPVI) [95].
- Les lysosomes sécrètent leurs constituants seulement lorsque la stimulation des plaquettes est maximale *in vitro*, cependant *in vivo*, les lysosomes ne sont pas forcément sécrétés, il s'agit d'enzymes telles que les hydrolases acides, la cathepsine D et E [91].

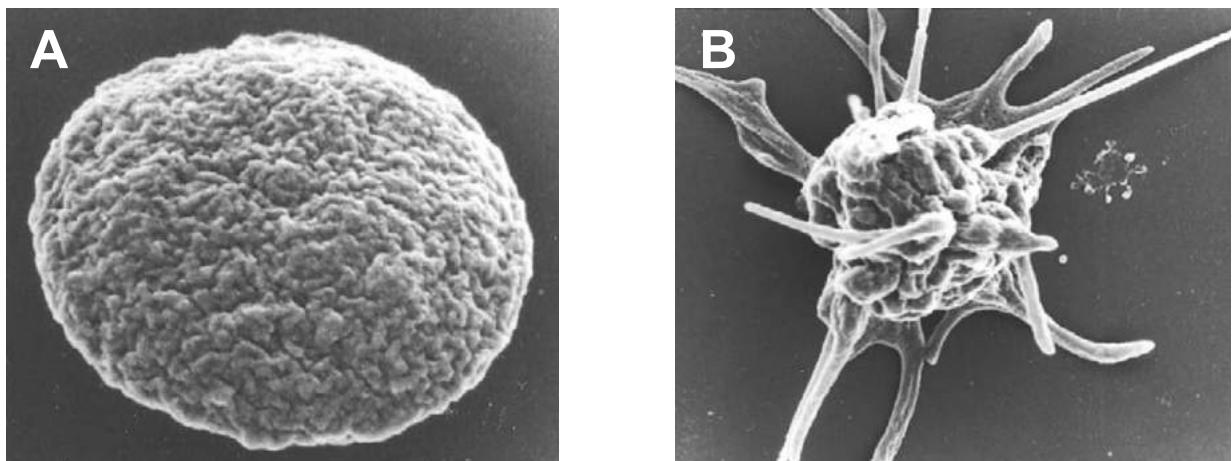


Figure 10 : Photographie par microscope électronique à balayage de plaquettes.
 (A) Plaquette au repos sous forme discoïde ($\times 30\,000$). (B) Plaquette activée, la formation de filopodes permet aux plaquettes de s'agréger entre elles ($\times 13\,000$). (D'après Michelson, [91])

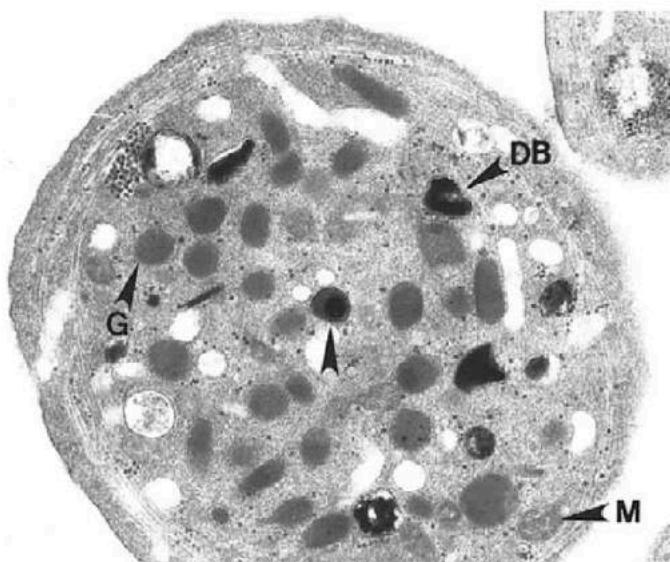


Figure 11 : Photographie par microscopie électronique à transmission de plaquettes au repos et la présence de différentes organelles.
 Les différentes organelles présentes dans le cytoplasme sont : les granules α (G), les granules denses (DB), les lysosomes (non représentés). (D'après Michelson, [91])

A l'état normal, les plaquettes circulent sous forme non-activée dans les vaisseaux sanguins, la propriété anti-thrombogénique de l'endothélium empêchant l'interaction des plaquettes sur celui-ci. L'activation plaquettaire fait suite à une lésion vasculaire comme la rupture ou l'érosion de la plaque d'athérome permettant l'exposition de facteurs pro-thrombogènes aux plaquettes. Chronologiquement il est possible d'observer trois phases conduisant à la formation du thrombus : l'adhésion, l'activation et l'agrégation (Figure 12).

- L'adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire endommagée implique des interactions multiples entre les récepteurs membranaires plaquettaires et leurs ligands retrouvés au niveau du sous-endothélium exposé. La MEC sous-endothéliale contient un réseau de fibrilles de collagène, ainsi que d'autres protéines d'adhésion telles que la fibronectine, la laminine et la thrombospondine [96]. Suite à la rupture de la plaque, les fibrilles de collagène sous-endothéliales sont exposées au vWF circulant, qui s'associent entre elles. Le contact initial entre les plaquettes sanguines circulantes et la lésion artérielle est établi par l'interaction de la GPIb-V-IX avec le vWF immobilisé au collagène [97]. Cette étape est importante pour ralentir les plaquettes le long de la paroi endommagée afin de permettre à la GPVI de se fixer au collagène, induisant une adhésion plus stable des plaquettes [98]. Il a été montré qu'en l'absence de la GPVI, les autres récepteurs sont incapables d'initier une adhésion plaquettaire stable et une agrégation au niveau de la paroi artérielle [99]. L'interaction de la GPIb-V-IX et GPVI favorise l'activation de la GPIIbIIIa et de la GPIa-IIa, induisant une adhésion stable et irréversible des plaquettes au collagène [100], [101].

- L'activation des voies de signalisation plaquettaire est induite parallèlement à l'adhésion et à la génération locale d'agonistes au niveau de la paroi artérielle, conduisant à une modification morphologique. La réorganisation du cytosquelette d'actine est responsable de la formation de filopodes et de la sécrétion granulaire, libérant des médiateurs secondaires [102]. Les principaux inducteurs de l'activation plaquettaire sont le collagène et les agonistes solubles comme la thrombine, l'ADP, le thromboxane A2 (TXA2) et l'adrénaline. La thrombine générée localement par l'activation du FT au niveau de la plaque d'athérome, induit l'activation des récepteurs PAR-1 et PAR-4. L'ADP intervient dans l'activation plaquettaire *via* les récepteurs P2Y1

et P2Y12. La stimulation de P2Y1 induit une élévation de calcium intracellulaire et l'activation de la GPIIbIIIa, alors que la stimulation de P2Y12 inhibe l'activité de l'adénhylate cyclase conduisant à une diminution de l'AMPc, responsable de l'agrégation plaquettaire [103].

- L'agrégation plaquettaire implique la réticulation des plaquettes activées ainsi que la mobilisation de la GPIIbIIa. Celle-ci subit également un changement de conformation qui expose son site de liaison au fibrinogène. La quantité importante de fibrinogène soluble couplée à la présence importante de GPIIbIIIa activée favorise la formation de liaison de pontage avec le fibrinogène ou avec le vWF entre plaquettes adjacentes.

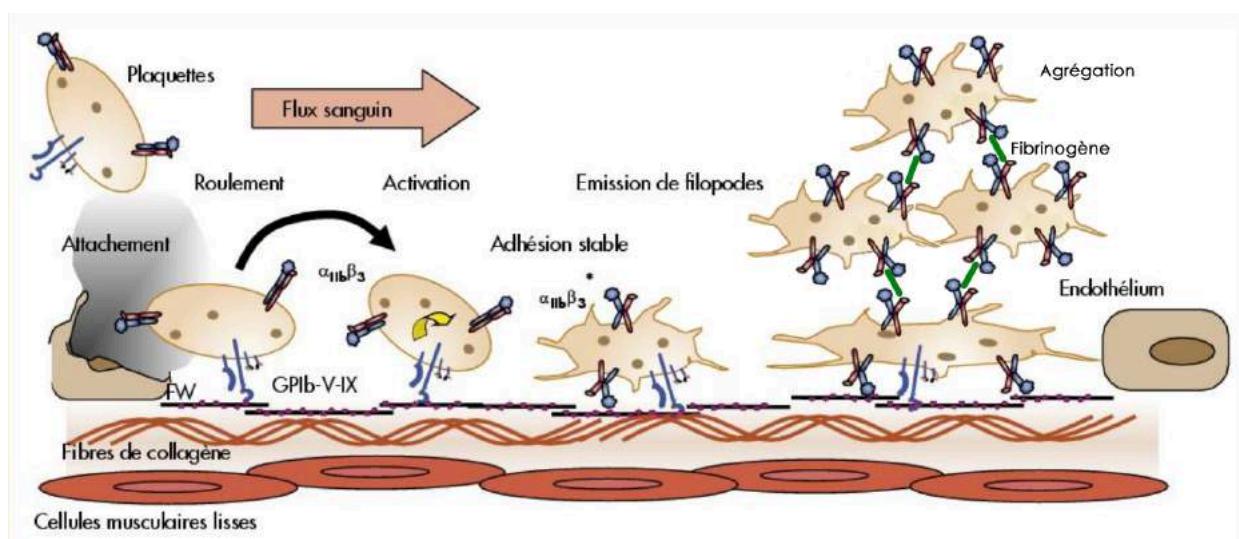


Figure 12 : Représentation schématique des différentes phases de l'activation plaquettaire par le sous-endothélium.

Suite à une lésion de l'endothélium vasculaire, les plaquettes vont être exposées à l'espace sous-endothélial pro-thrombogène. Les plaquettes vont d'abord rouler, puis s'immobiliser, entraînant leur activation. Cette activation provoque l'émission de filopodes et la dégranulation de celles-ci, participant à l'activation et à l'agrégation stable d'autres plaquettes circulantes.

V. Particularité du remodelage vasculaire au cours de l'IRC : vasculopathie urémique

1. Complications liées à la vasculopathie urémique

- Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) est l'une des complications majeures et précoces de l'IRC. Son incidence et sa sévérité augmentent avec le degrés de l'insuffisance rénale. L'HTA entraîne des effets délétères sur l'ensemble du système cardiovasculaire, d'une part, par ses effets hémodynamiques, mais d'autre part en favorisant l'athérosclérose. De plus, l'HTA agrave par elle-même l'insuffisance rénale en augmentant la pression au niveau des capillaires glomérulaires et la sclérose des artéries intra-rénales, qui se surajoute aux lésions rénales préexistantes. Son traitement est donc primordial dans le traitement de l'IRC.

Deux mécanismes principaux interviennent dans l'apparition de l'HTA chez les patients urémiques : la surcharge hydrosodée, conduisant à une augmentation du volume sanguin, ainsi qu'à la forte sécrétion de rénine, provoquant une libération importante d'angiotensine II, hormone vasoconstrictrice.

A ces deux mécanismes, s'ajoute une augmentation du tonus sympathique et de la production d'endotheline, ainsi qu'une diminution de l'élasticité de la paroi de l'aorte et des grosses artères, favorisant l'élévation de la pression artérielle, notamment la pression systolique et la pression pulsée, facteurs d'hypertrophie ventriculaire gauche.

- Atteintes cardiaques

Une atteinte cardiaque est également fréquente chez les patients urémiques. De multiples facteurs sont incriminés, principalement dominés par l'HTA et l'ischémie coronarienne ou le cumule de ces deux mécanismes, favorisant l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) [104], [105].

L'HVG est très fréquente, pratiquement constante au stade d'IRC avancée. Elle est favorisée, d'une part, par l'HTA et la rigidité des grosses artères, entraînant une surcharge de pression du ventricule gauche, et, d'autre part, par la surcharge en sodium provoquant une augmentation du volume sanguin. Ces deux mécanismes sont souvent associés. De plus, l'HVG se caractérise par une fibrose du myocarde, due aux conséquences de la toxicité de l'urémie [105], [106].

- Lésions artérielles accélérées

L'athérosclérose et l'artériosclérose sont l'une des complications majeures de l'IRC ; dite « accélérée » puisque la fréquence des complications cliniques de celle-ci, notamment l'infarctus du myocarde, est 3 fois plus élevée, à âge égal, chez les patients urémiques que dans la population générale [5], [107], [108].

Cette accélération s'accompagne d'une augmentation de la gravité des lésions athéromateuses (Figure 13). En effet, il a été montré que la sévérité des lésions est corrélée à la diminution du DFG. Aux stades 4 et 5 de l'IRC, la proportion de patients ayant des plaques d'athérome avancées est 19% plus importante que chez des patients ayant une IRC de stade 1 et 2 [108], [109].

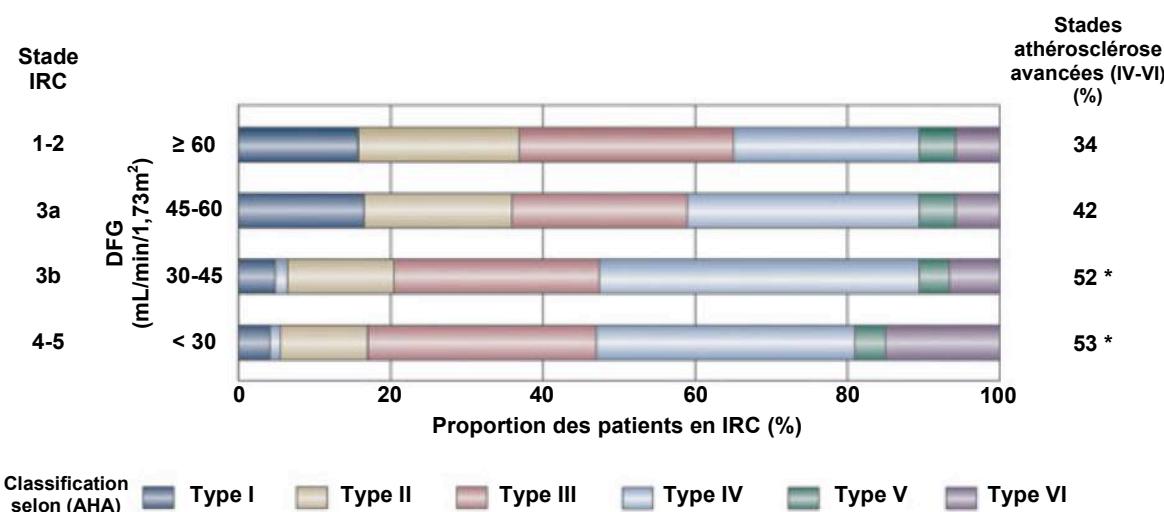


Figure 13 : Proportions des différents types de lésions athérosclérotiques en fonction du stade d'IRC.

La sévérité des lésions athérosclérotiques (selon la classification de l'American Heart Association) retrouvées post-mortem, chez des patients atteints de différents stades d'insuffisance rénale chronique. Pour chaque stade d'IRC, le DFG et la proportion des stades avancés de l'athérosclérose (types IV-VI) est représenté. * $P<0,05$ vs $\text{DFG} \geq 60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$. (D'après Nakano et al., [109])

Différents facteurs contribuent au développement des lésions athérosclérotiques et artériosclérotiques chez les patients IRC. Certains facteurs de ces lésions sont communs à d'autres pathologies, majorés au cours de l'IRC, comme l'HTA, la dyslipidémie, le tabagisme ou le diabète (Figure 14).

- L'HTA favorise le développement de l'athérosclérose dû aux fortes contraintes de tension et du stress oxydant, induisant une altération de l'endothélium [110].
- La dyslipidémie au cours de l'IRC est fortement athérogène, et apparaît à des stades précoce de l'IRC. Il y est retrouvé une augmentation du cholestérol LDL et des triglycérides parallèlement à une diminution du cholestérol HDL. Cette dyslipidémie est fortement corrélée à la survenue de complications vasculaires chez les patients urémiques. De plus, l'élévation de la lipoprotéine (a) (Lp(a)), fortement athérogène, est fréquemment retrouvée chez les patients urémiques [111], [112].
- Le tabagisme est un facteur majeur de développement de l'athérosclérose dans la population générale, car la nicotine majore le stress oxydant, mais ces effets sont amplifiés chez les patients urémiques du fait de sa rétention [113], [114].
- Le diabète, de type 1 et 2, est facteur de développement d'athérosclérose. Chez les patients urémiques diabétiques, le risque de mortalité causé par des complications cardiovasculaires est deux fois plus élevé comparé à des patients urémiques non-diabétiques [115].

A ces complications s'ajoutent d'autres facteurs spécifiques de l'IRC tels que les troubles du métabolisme phosphocalcique, intervenant dans la formation de dépôts calciques dans la média des artères et des coronaires [116]. Le rôle du stress oxydant et de l'état inflammatoire chronique au cours de l'IRC, contribuent aux étapes initiales de l'athérogenèse [117], [118]. Ce stress oxydant intervient également dans la peroxydation des lipides aggravant l'athérosclérose [119].

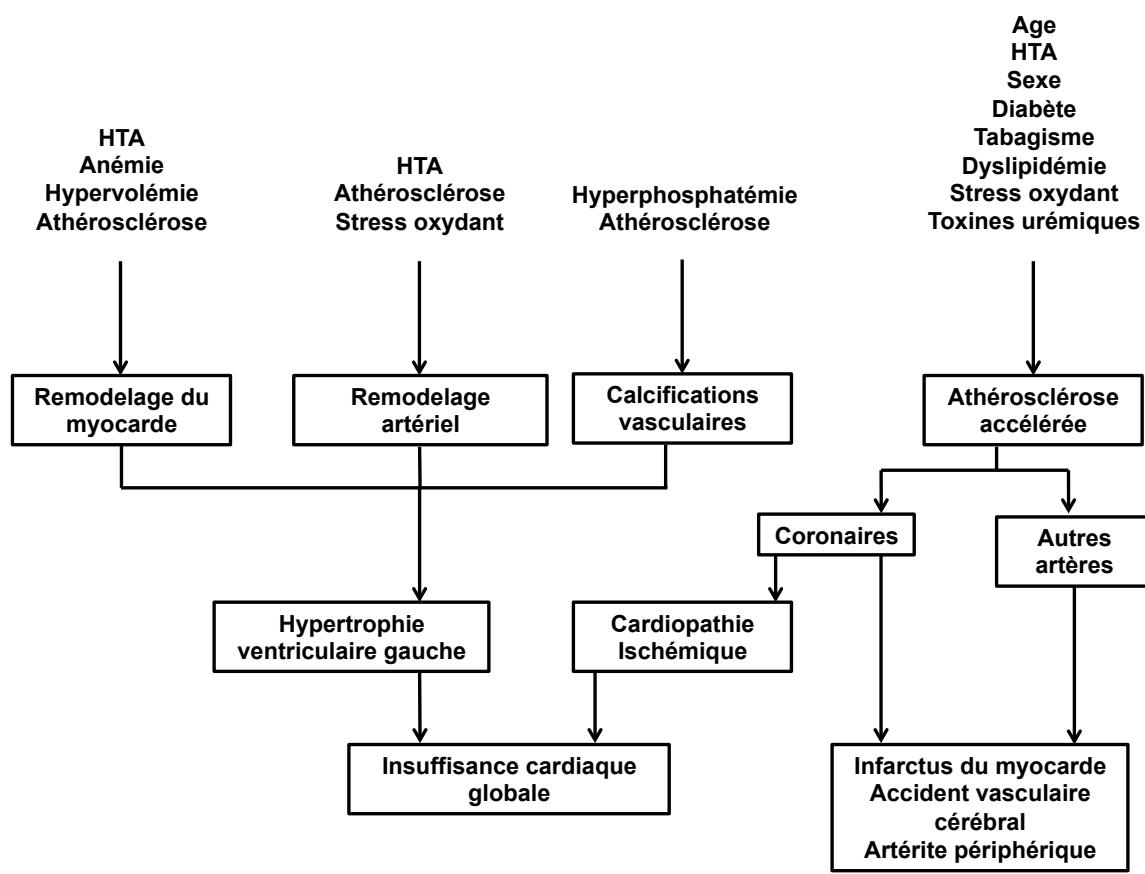


Figure 14 : Facteurs et mécanismes favorisant des atteintes cardiovasculaires au cours de l'IRC.

(Adapté d'après Jungers et al, [120])

2. Particularité de l'athérogenèse et de la thrombose au cours de l'IRC

2.1. Dysfonction endothéliale

L'endothélium est une barrière physique, séparant les composants de la paroi vasculaire et le contenu de la lumière du vaisseau. Cette barrière permet les mouvements de petits solutés, participant à l'autorégulation des tissus, la régulation du trafic cellulaire et nutritif. L'endothélium agit également sur la vasomotricité de la paroi artérielle, contribue à l'équilibre local entre les médiateurs pro- et anti-inflammatoires ainsi que l'activité pro-coagulante et anti-coagulante [121].

En raison de sa grande surface au niveau de l'organisme, l'endothélium joue un rôle important et son intégrité peut être altérée, entraînant la perte de son rôle de barrière protectrice. La dysfonction endothéliale est la première étape de la cascade d'événements conduisant à l'athérosclérose, elle est caractérisée par la diminution de la capacité vasodilatatrice des vaisseaux, de la présence de molécules impliquées dans la coagulation, l'adhésion cellulaire et l'inflammation, ainsi que la présence de phénomène de réparation endothéliale. Si cette dysfonction est prolongée, elle peut aboutir à l'apoptose des cellules endothéliales [121], [122], [123].

Au cours de l'IRC, le stress oxydatif important est l'une des principales causes de la dysfonction endothéliale conduisant à la diminution de vasodilatation de la paroi artérielle. En effet le stress oxydant diminue la biodisponibilité et la production du monoxyde d'azote (NO) par la réduction de l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS), mais également par la diminution de la production de prostacycline (PGI2) et du facteur hyperpolarisant endothérial (EDHF). L'augmentation de l'inhibiteur de la eNOS, *l'asymmetric dimethylarginine* (ADMA) est retrouvée au cours de l'IRC [124]. L'IRC induit également une augmentation de la libération par les cellules endothéliales, de molécules pro-thrombotiques telles que : du facteur VonWillebrand, du facteur tissulaire et de PAI-1 [125], de VCAM-1, ICAM-1, E-sélectine et de VEGF [126]. L'altération de l'endothélium, au cours de l'IRC induit une augmentation de la formation de microparticules endothéliales, formées à partir de la membrane plasmique suite à une activation ou à une dégradation de l'endothélium [127], [128]. Il a été montré que ces microparticules induisent la formation de thrombus [129].

L'endothélium normal a la capacité de se réparer grâce aux cellules progénitrices endothéliales (CPE) circulantes qui constituent un système luttant contre la formation de l'athérosclérose. Les CPE sont des cellules immatures pouvant entrer au niveau de l'endothélium induisant la réparation de celui-ci [127]. La diminution de la capacité réparatrice de l'endothélium participe à la dysfonction endothéliale. Chez les patients atteints d'IRC, il a été montré une diminution du nombre de ces cellules progénitrices mais également une diminution de leurs activités migratoires, favorisant les lésions endothéliales [130].

2.2. Inflammation chronique

Il est maintenant reconnu que l'urémie est associée à un état d'inflammation systémique chronique de faible intensité [131]. Bien que de multiples facteurs de l'inflammation soient liés, les causes de celle-ci ne sont pas toujours bien connues. En effet, on peut distinguer des facteurs inflammatoires liés à la procédure de dialyse chez les patients atteints d'IRC au stade terminal *via* la rétention de molécules pro-inflammatoires contribuant à la formation de maladies cardiovasculaires, mais également à des facteurs dûs à la diminution de la fonction rénale [132], [118].

Les patients urémiques sont affectés par un état inflammatoire chronique représenté par des niveaux élevés de protéines de la phase aigüe de l'inflammation telles que la protéine C-réactive (CRP) ou la Sérum amyloïde A (SAA) [133], [134], [135] conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : l'interleukine 1 (IL-1), l'interleukine 6 (IL-6) et le *tumor necrosis factor* (TNF- α), également élevé au cours de l'IRC [136], [137]. Il a été montré que cette augmentation des cytokines pro-inflammatoires au cours de l'IRC était liée à une augmentation de la rigidité artérielle.

Cette accentuation de la dysfonction endothéliale parallèlement à une inflammation chronique au cours de l'IRC induit une forte prédisposition aux phénomènes de modifications de la paroi vasculaire.

2.3. Dysfonction plaquetttaire

Les données de la littérature sur la fonction plaquetttaire au cours de l'IRC sont mitigées, en effet plusieurs études montrent que la fonction plaquetttaire est insuffisante d'une

part alors que d'autres décrivent une hyperactivité plaquettaire au cours de l'IRC [138]. En effet, chez les patients atteints d'insuffisance rénale, des taux accrus de phosphatidylsérine ont été observés à la surface des plaquettes. La phosphatidylsérine se lie au facteur V activé qui favorise la liaison du facteur X conduisant à la formation de thrombine avec formation de thrombus [139]. Les plaquettes de patients urémiques contiennent des taux accrus de P-sélectine ainsi que d'intégrine α IIb β 3, conduisant à des agrégats leucoplaquettaires, mais également une réactivité accrue des plaquettes [138]. Il a été démontré que chez les patients urémiques, la diminution du NO était associée à une augmentation de l'agrégabilité plaquette[140]. Plus récemment il a été montré que certaines toxines urémiques comme les indoles sulfates sont capables d'induire une hyperactivité plaquette, contribuant à la formation de thrombus chez des souris urémiques [129], [141].

3. Les calcifications vasculaires

Les calcifications vasculaires (CV) sont des pathologies dégénératives de la paroi vasculaire. Dans la population générale, les CV sont associées au vieillissement, au diabète, à l'athérosclérose mais sont également fortement développées et étendues au cours de l'IRC. Les CV sont associées à un risque accru de mortalité et des complications cardiovasculaires. Ce phénomène a longtemps été considéré comme un dépôt passif de minéraux au sein de la paroi, mais en réalité, il est maintenant bien établi qu'il s'agit d'un processus cellulaire actif et très régulé, qui partage des similitudes avec la formation osseuse. Il existe plusieurs types de calcifications décrites, en fonction de leur localisation : les calcifications intimes, médiales, valvulaires et l'artériopathie calcifiante urémique (calciphylaxie) [142].

La calcification athérosclérotique est la forme la plus courante de calcification vasculaire et commence à se former dès la deuxième décennie de vie [52]. Dans les plaques d'athérome plus évoluées de type IV et V, des agrégats de cristaux d'hydroxyapatite peuvent être détectés. Le degré de calcification est corrélé avec l'étendue de la plaque d'athérome [143].

La calcification médiale, également appelée sclérose de Mönckeberg, est organisée le long des lames élastiques et est associée aux CMLv. La calcification médiale est

retrouvée dans plusieurs pathologies telles que le diabète et l'IRC et peut se former indépendamment de la formation de plaque d'athérome. Les dépôts de calcium peuvent être observés au niveau de la média à un stade précoce de l'IRC [144].

La calcification valvulaire est caractérisée par une déposition de calcium au niveau des valves aortiques en réponse à un stress mécanique, l'augmentation du phosphate et calcium au cours de l'IRC et d'un infiltrat inflammatoire accompagné d'accumulation de lipides.

L'artériopathie calcifiante urémique est un type sévère de calcification vasculaire médiale et répandue qui se produit chez les patients atteints d'IRC en phase terminale. Elle affecte les artères et les artéries cutanées et sous-cutanées, liée à un épaississement intimal *via* la fibrose et la formation de thrombus au niveau de celle-ci [145], [146].

3.1. Mécanismes des calcifications vasculaires

Le développement de CV est généralement considéré comme le résultat d'un déséquilibre entre les inducteurs de la calcification, tels que l'inflammation, les troubles minéraux et les inhibiteurs comme la Fetuin A, la Matrix Gla Protéine (MGP), l'ostéopontine (OPN), l'ostéoprotégerine (OPG) et le pyrophosphate (PPi) principalement [147], [148]. En effet, dans l'organisme la présence de ces inhibiteurs de la calcification réduit les dépôts de calcium et de phosphate tissulaire (Figure 15).

L'un des premiers événements dans l'induction de la calcification est la mort des CMLv et la libération de corps apoptotiques et de vésicules matricielles. Il a été démontré que l'apoptose des CMLv survient avant la formation de nodule de calcification et que l'inhibition de l'apoptose réduit la calcification [149]. Les corps apoptotiques et les vésicules matricielles dérivés des CMLv sont capables de former des structures de nucléation afin de former des cristaux de calcium, grâce la présence de la phosphatase alcaline (PAL) à la surface de celles-ci [150]. Ce phénomène est accentué au cours de l'IRC, les niveaux élevés de phosphate inorganique (Pi) et de calcium (Ca^{2+}) induisent l'apoptose des CMLv [151].

L'augmentation accrue de Pi et de Ca²⁺, l'inflammation et le stress oxydant conduisent également à la différenciation ostéo-chondrogénique des CMLv, ou des cellules interstitielles au niveau des valves aortiques (CIV) via l'induction de facteur de transcription comme Runx2, Osterix, Msx2 et Sox9 [152], [153]. Runx2 est considéré comme le facteur de régulation principal de l'ostéo-différenciation, sa délétion est létale, n'induisant pas de formation osseuse chez la souris [154]. Le co-transporteur de phosphate-1 (PiT-1), est le transporteur de phosphate principalement retrouvé à la surface des CMLv. L'augmentation du Pi induit l'expression de PiT-1 et l'entrée accrue de Pi intracellulaire conduisant à l'expression de Runx2 [155]. L'incubation de CMLv avec du sérum issue de patient urémique induit une augmentation de l'expression de Runx2, liée d'une part à l'augmentation de Pi mais également à la présence de *Bone Morphogenetic Protein 2* (BMP-2) [156]. BMP-2 est une protéine sécrétée appartenant à la famille des TGF-β, induisant l'ossification. L'activation de Runx2 est également associée à la production et au remodelage de la MEC avec la synthèse et le dépôt de collagène de type I, II, IX et XI, formant une matrice solide, permettant la précipitation des cristaux d'hydroxyapatites en collaboration avec la PAL [157].

La dégradation des fibres élastiques est également importante lors de la calcification vasculaire, puisqu'intrinsèquement, l'élastine possède une grande affinité pour le calcium. La fragmentation de l'élastine libère des acides aminés polaires, accentuant cette affinité de l'élastine pour le calcium. Les MMPs sécrétées par les CMLv, les macrophages ou les cellules spumeuses, sont impliquées dans la dégradation de l'élastine et responsables de la déposition de calcium [158].

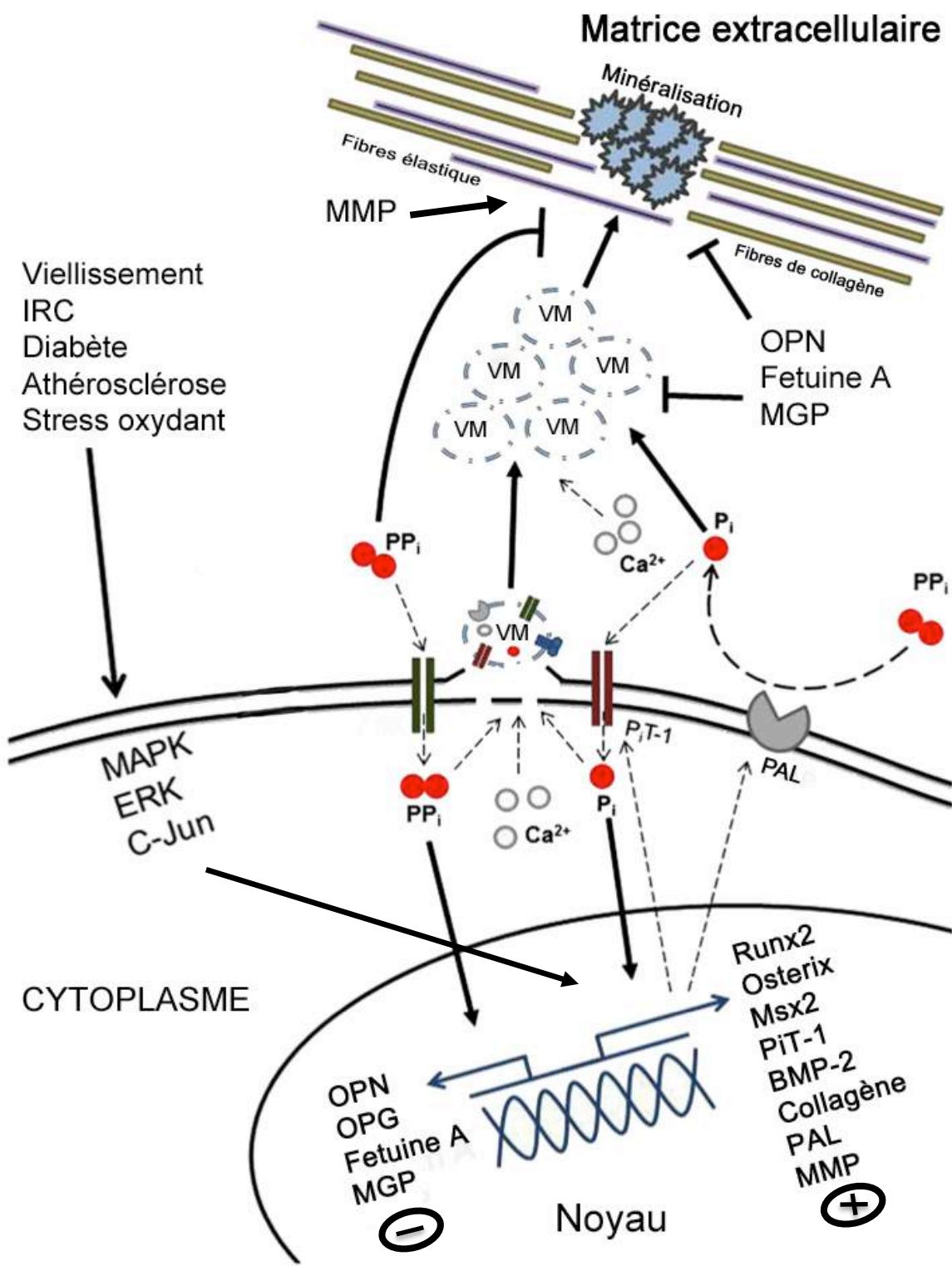


Figure 15 : Représentation schématique des principaux acteurs de la calcification vasculaire.

Le vieillissement, l'IRC, le diabète, l'athérosclérose ou le stress oxydant induisent un déséquilibre entre l'expression des inhibiteurs (-) et des inducteurs (+) de la calcification, conduisant à la formation de vésicules matricielles, la dégradation des fibres élastiques et la synthèse de collagène.

VI. Récepteur des produits de glycation avancée : RAGE

1. Découverte et rôle de RAGE

Au début des années 90, une équipe américaine découvre une nouvelle molécule capable de fixer les protéines modifiées par le glucose, à la surface des cellules endothéliales bovines [159]. Ce récepteur est retrouvé également chez l'homme et plusieurs études ont révélé que RAGE peut fixer une grande diversité de ligands faisant parti des récepteurs de reconnaissance de motif ou pattern de recognition receptor (PRR) [160]. Ces ligands, en plus des AGEs, comprennent les protéines de la famille des S100/calgranuline [161]-[162], high-mobility group box-1 (HMGB1) [163], les fibrilles amyloïdes[164] , Mac-1 [160], l'acide lysophosphatidique [165], ainsi que la SAA.

Chez une personne saine, une faible expression de RAGE est retrouvée dans la plupart des tissus comme le foie, le cerveau, le cœur, le rein, le muscle squelettique. Cependant, au niveau des poumons, une expression importante de RAGE est observée [166]. Au niveau cellulaire, RAGE est exprimé au niveau de la paroi vasculaire par les cellules endothéliales, les CMLs, dans le poumon par les cellules épithéliales alvéolaires, les cellules nerveuses, hépatiques et mésangiales [167]. Au niveau circulant, RAGE est retrouvé dans les monocytes/macrophages, les lymphocytes T, les neutrophiles et également à la surface des plaquettes sanguines [168], [169], [166]. Une présence importante de RAGE est observée dans plusieurs pathologies telles que le diabète [170], les maladies cardiovasculaires [171], le cancer ou les maladies neurodégénératives [172], [175]. RAGE est responsable du transport des β -amyloïdes au travers de la barrière hémato-encéphalique, favorisant l'apparition des plaques amyloïdes [174].

2. Ligands de RAGE

2.1. Les produits de la glycation avancée

La glycation est une réaction non enzymatique qui se produit entre un glucide et une molécule possédant un groupement amine libre, comme les protéines. Cette réaction découverte en 1912 par Louis-Camille Maillard [175], est spontanée dans l'organisme, irréversible et cumulative. Ce processus aboutit à la formation de produits de la glycation avancée (AGEs).

Les produits de glycation peuvent être apportés par la nourriture ou être formés dans le corps de manière endogène. L'apport alimentaire des produits glyqués est principalement dû à la méthode de cuisson des aliments, en effet cette réaction est responsable d'une modification des arômes (goût) et de la coloration (brunissement) : caramel, frites, barbecue ...

A l'état physiologique, un niveau basal de glycation endogène est retrouvé, cette glycation participe au processus de vieillissement tissulaire. Dans certaines pathologies comme le diabète, le processus de glycation est fortement augmenté, puisque les protéines sériques sont en contact avec une concentration importante de glucose liée à une hyperglycémie.

Les AGEs sont les produits de trois voies de formations : la glycation non-enzymatique, la glycoxydation et la voie des polyols (Figure 16) [176].

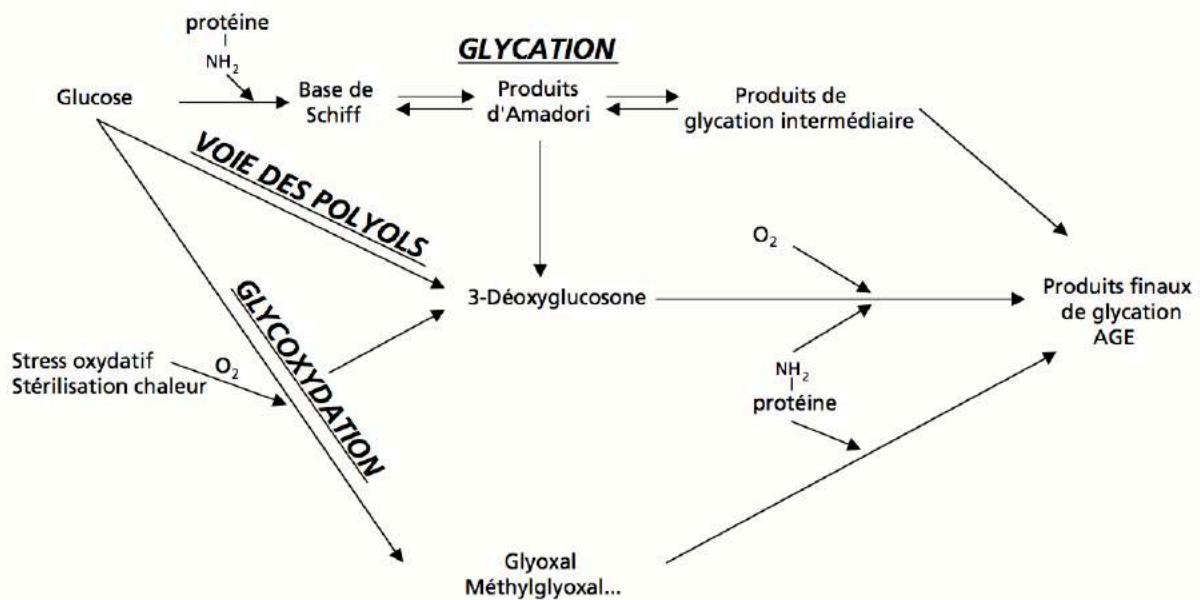


Figure 16 : Représentation schématique des différentes voies conduisant à la formation des AGEs.
(D'après Boulanger, [177])

La glycation endogène fait principalement intervenir le glucose, qui est le sucre réducteur le plus présent dans l'organisme, avec des groupements amines libres portés par les acides aminés lysine et arginine des protéines (Figure 17).

Lors de la première étape, une condensation du groupement carbonyle du sucre et du groupement aminé de la protéine est observée formant ainsi une base de Schiff. Un réarrangement moléculaire nommé Amadori va alors s'opérer. Ce processus est réversible par hydrolyse chimique. Le taux de formation de ces produits d'Amadori est proportionnel à la concentration en sucre et peuvent aboutir à des AGEs sans la formation de produit intermédiaire, ou bien, le résidu glucidique peut subir différentes transformations. Une partie du résidu peut se détacher formant des produits intermédiaires de glycation : les aldéhydes glyoxal et méthylglyoxal, hautement réactifs pouvant se fixer à d'autres protéines conduisant également à des AGEs.

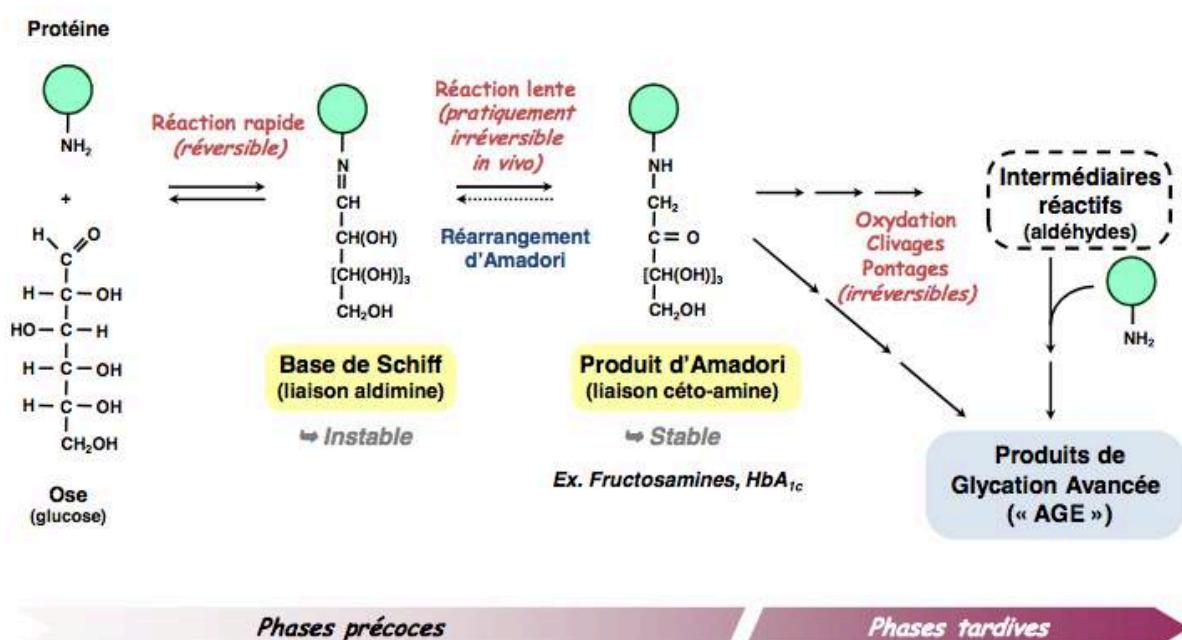


Figure 17 : Représentation schématique de la formation de produits de glycation avancée.

La glycoxidation est une autre voie de formation des AGEs, elle est due à un stress oxydatif important issue de l'auto-oxydation du glucose ou de la peroxydation des lipides. Les produits intermédiaires ainsi formés vont réagir avec un groupement aminé

et conduire à la formation des AGEs (CML, pyrraline) sans réarrangement préalable. Cette réaction est principalement la source de formation des AGEs au cours de l'IRC [178].

La voie des polyols est également impliquée dans la formation des AGEs, formant des produits intermédiaires de la glycation.

Des mécanismes endogènes existent afin d'éviter l'accumulation des AGEs en bloquant leur formation, telle que la glyoxalase I, qui par son activité empêche l'accumulation des α -oxoaldéhydes, empêchant ainsi la formation des AGEs [179]. Cependant l'activation de l'Axe AGE-RAGE induit un stress oxydant, participant à l'augmentation des AGEs mais également en diminuant l'activité et l'expression de la glyoxalase I [180],[181].

2.2. Autres ligands de RAGEs

2.2.1 Les protéines de la famille de S100

La famille des protéines S100 ou calgranulines regroupe 24 membres différents, ce sont des protéines de faible poids moléculaire (10-14kDa) capable de former des homo- et hérérodimères, qui lient le calcium. Ces différentes protéines ont pour caractéristique commune leur solubilité dans une solution de sulfate d'ammonium saturée à 100%, d'où leur nom [182]. Les protéines S100 sont généralement impliquées dans un grand nombre d'activités cellulaires telles que la signalisation, la différenciation cellulaire, la régulation de la migration, la transcription, ainsi que dans le cycle cellulaire [183]. Ces fonctions sont dépendantes de leurs capacités à fixer le calcium mais également le zinc et le cuivre, permettant d'induire un message intracellulaire. Cependant, certaines protéines S100 peuvent être sécrétées comme la S100A8/A9, la S100B et le S100A12, et exerce principalement des activités chimiotactiques, induisant le recrutement de cellules inflammatoires [184]. On sait actuellement que les protéines S100 peuvent interagir avec le récepteur RAGE [185].

2.2.2 Sérum Amyloïde A

La sérum amyloïde A (SAA) est une protéine de la phase aigüe de l'inflammation, majoritairement produite par le foie, elle peut être sécrétée 100 à 1000 fois sa valeur normale [186]. Si l'inflammation régresse, la décroissance de la SAA est rapide (demi-vie de 12 heures). C'est une apolipoprotéine associée aux *high-density lipoprotein* (HDL), qui permet le transport du cholestérol des HDL vers le site d'inflammation, notamment vers les macrophages [187]. La SAA est un marqueur de risque de maladie cardiovasculaire, elle est associée à la progression des lésions athéromateuses [188]. Il a été montré chez des souris ApoE^{-/-}, que le taux plasmatique de SAA était augmenté et que celle-ci peut être produite par les cellules de la paroi artérielle [189]. L'inflammation chronique facilite la liaison des HDL-SAA aux protéoglycannes vasculaires et favorise leur rétention. Il a été montré que RAGE peut se lier à la SAA, induisant un stress cellulaire [190].

2.2.3 High Mobility Group Box protein-1 (HMGB-1)

HMGB-1/amphotérine est une protéine ubiquitaire de 30 kDa retrouvée dans le cytosol et dans le noyau. Initialement HMGB-1 a été définie comme une protéine nucléaire importante dans la régulation de la transcription, en provoquant une flexion de l'ADN, permettant la liaison de plusieurs complexes protéiques à l'ADN tels que les recombinases, les récepteurs hormonaux et les protéines du complexe transcriptionnel. Une augmentation de l'expression de HMGB-1 est retrouvée dans de nombreuses cellules tumorales, accélérant la progression du cycle cellulaire [191]. HMGB-1 peut être sécrétée par plusieurs types cellulaires soit de manière active après acétylation de celui-ci dans le noyau [192], [193] soit de manière passive lors de la nécrose cellulaire [194]. HMGB-1 peut interagir avec les *toll-like receptors* (TLR) 2, 4 et RAGE, conduisant à la translocation de NF-κB [195], [196]. Cette interaction a été récemment décrite comme une voie conduisant à l'apoptose lymphocytaire dans un modèle murin de lupus érythémateux systémique [197].

3. Structure de RAGE

La structure de RAGE, la plus retrouvée est la forme entière du récepteur, formant une protéine membranaire de 45 à 50 kDa, composée de 404 acides aminés [198]. RAGE est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines, possédant un domaine de fixation extracellulaire, d'un seul domaine transmembranaire ainsi que d'un court domaine cytoplasmique. La région extracellulaire permet la fixation des différents ligands, elle est constituée de 3 domaines immunoglobuliniques : le domaine variable « V », ainsi que deux domaines constants « C1 et C2 » (Figure 18) [198].

Les premières études portées sur l'interaction de RAGE avec ses ligands ont montré que celle-ci était réalisée *via* le domaine V [199], mais il a été démontré par la suite que certains ligands peuvent se lier aux domaines C. En effet, ces études ont montré que les domaines V et C1 étaient liés, permettant la fixation des ligands et fonctionnant comme une unité structurale unique [200]. En revanche le domaine C2 fonctionnerait comme une charnière flexible entre les domaines V-C1 et la partie transmembranaire [201]. RAGE possède un seul domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique hautement chargée, formée de 43 acides aminés. Cette queue cytoplasmique est essentielle à la signalisation du récepteur, et lorsque celle-ci est absente, il n'y a aucune signalisation en présence d'AGEs [202].

Bien que les AGEs et les ligands de RAGE présentent des structures chimiques variées, ils présentent des caractéristiques communes. La première caractéristique est qu'ils possèdent une charge négative importante. La deuxième caractéristique est la structure multimérique des ligands de RAGE et AGEs (liée à la création de liaisons transversales covalentes) [203], [204].

Ces deux caractéristiques structurales des différents ligands sont importantes pour l'activation de RAGE. En effet, la capacité de liaison de RAGE à ses différents ligands réside par des interactions électrostatiques entre la surface chargée positivement du domaine V-C1, formée par des résidus arginine et lysine hautement conservés, et la charge négative des ligands [189], [204], [205].

De plus, il a été montré que RAGE était capable de former des oligomères à la surface membranaire de manière constitutive, présentant une orientation parallèle, formée des sous-unités V-C1 permettant des contacts latéraux, impliquant principalement des résidus au niveau du domaine C1 (Figure 19). La surface de contact contient plusieurs

résidus chargés et est reliée par des liaisons hydrogènes et des interactions polaires médiées par un ion zinc [201], [204]. Ces assemblages de RAGE sont stabilisés par la liaison de ligands multimérique tels que le S100A12, S100B ou les AGEs et peut expliquer l'hyperactivation de la voie RAGE dans le développement de trouble inflammatoire, conduisant à un rétrocontrôle positif de celui-ci.

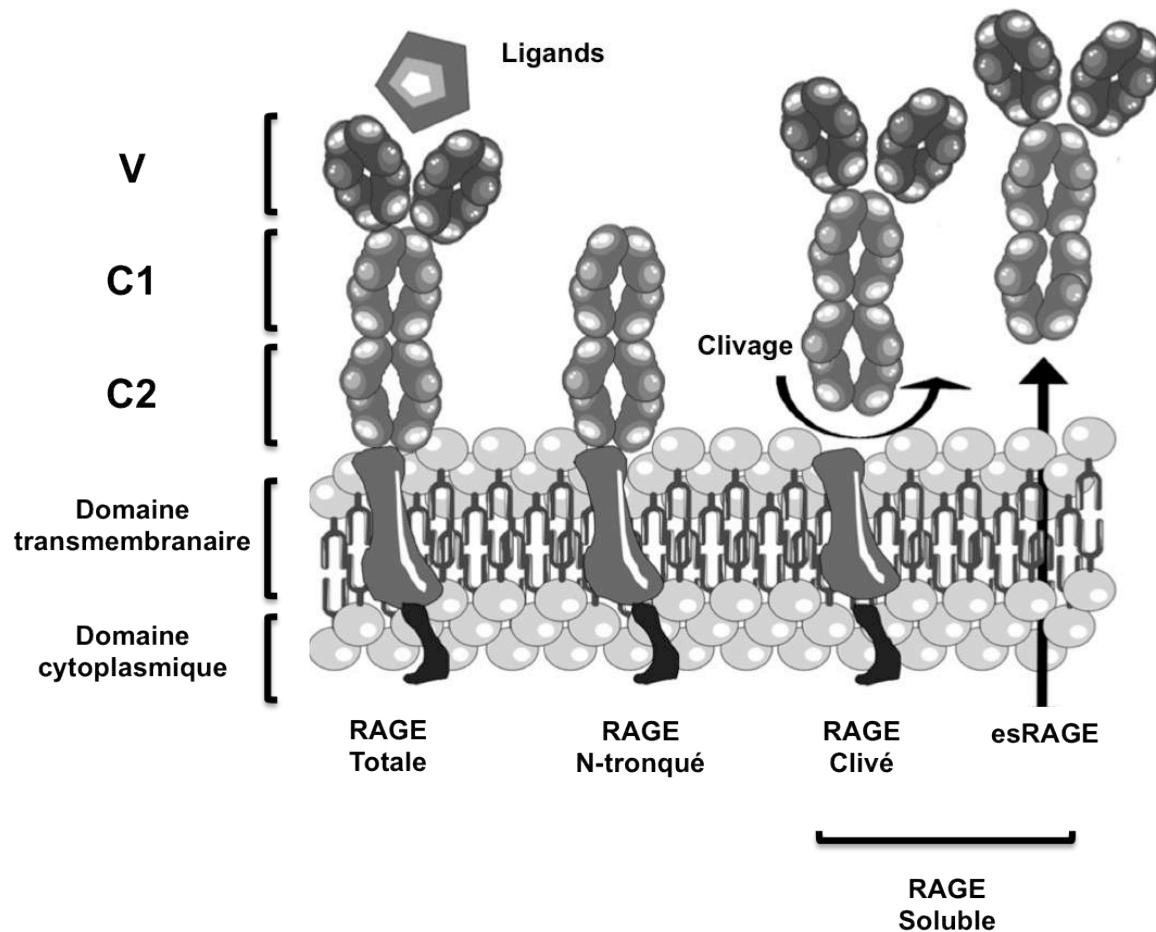


Figure 18 : Représentation schématique des différentes formes de RAGE.

La forme totale de RAGE est composée d'un domaine immunoglobuline variable (V) et de deux domaines immunoglobulines constants (C1 et C2), d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine cytoplasmique. La forme N-tronquée, ne possède pas le domaine variable. Les formes solubles de RAGE sont formées soit par clivage enzymatique du RAGE total, soit par expression d'un variant extracellulaire seulement (esRAGE). (D'après Basta, [206])

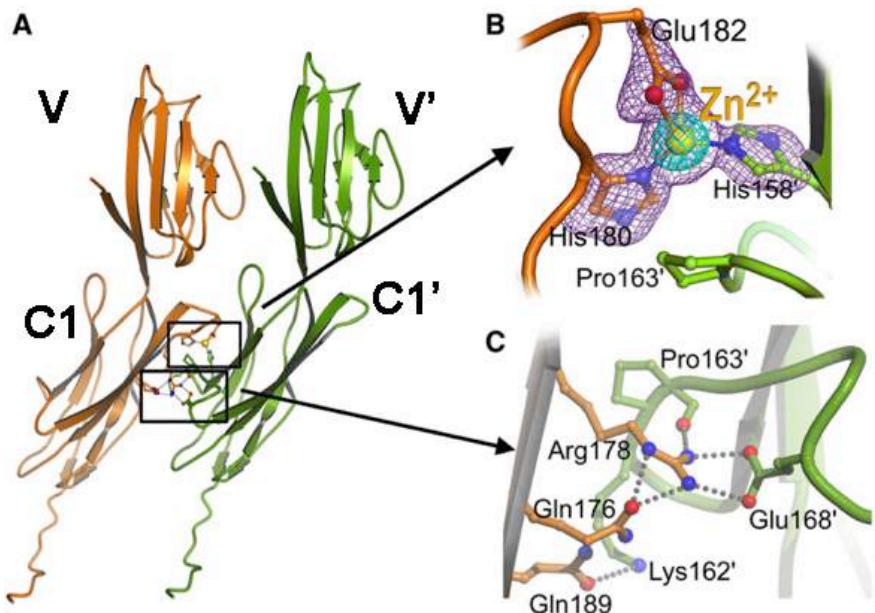


Figure 19 : Assemblage de deux domaines V-C1 de RAGE.

(A) Représentation en ruban de l'assemblage de deux domaines V-C1 (une en orange « V-C1 » et l'autre en vert « V'-C1' ») de RAGE, interagissant principalement via le domaine C1. (B et C) Le contact entre les deux molécules implique un ion Zn^{2+} (B) et des liaisons hydrogène (C). (D'après Koch, [201]).

4. Régulation de l'expression et de l'activité de RAGE

RAGE est codé par un gène unique nommé *Ager*, localisé sur le chromosome 6 dans la région 6p21.32. Cette région est proche du locus HLA et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe III (CMH III) [207]. Ces groupes de gènes sont impliqués dans la réponse immunitaire et le rejet de greffe. Le locus du CMH III code également pour des cytokines comme le TNF- α , des *Heat Shock Proteins* (HSP) et des composants du complément [208].

L'implication de ce récepteur dans de nombreuses voies de signalisation suggère que son expression et son activité soient contrôlées par différents mécanismes.

4.1. Régulation de la transcription de RAGE

La transcription de RAGE est contrôlée par plusieurs facteurs de transcription, tels que SP-1, AP-2, NF - κ B et NF - IL6 [209]. L'expression de RAGE est constitutive mais peut être induite dans certaines conditions pathologiques. Il existe plusieurs régions promotrices de la transcription de RAGE dont une entre -1543/-587 bp présentant deux sites de fixation pour le facteur de transcription NF- κ B. Cette voie peut être initiée par des cytokines pro-inflammatoires. Un site de fixation au facteur de transcription est également retrouvé au niveau de la région -245/-40 bp.

Deux polymorphismes de la région promotrice de RAGE ont été observés au niveau des régions -374T/A et -429T/C, cependant ces régions ne sont pas des sites de fixation de NF-κB ou de Sp-1, mais celles-ci sont associées aux complications athérosclérotiques [210].

Il a été observé que dans certaines tumeurs du poumon, l'expression de RAGE était diminuée [211], alors que dans d'autres cancers, l'expression de RAGE était augmentée [212]. RAGE participerait dans ce cas, à la croissance et la progression de la tumeur en alimentant l'inflammation du microenvironnement tumoral [213].

4.2. Régulation par épissage alternatif

Il a été répertorié plus de 20 variants d'épissage alternatif de RAGE chez l'Homme [214], ou chez la souris [215], cependant seule une petite fraction de ces différents épissages est traduite en protéines et exprimée à un niveau suffisant pour induire un signal cellulaire. Plus de 50% des ARNm issus d'un épissage alternatif sont dégradés. Chez la souris par exemple, le taux de transcription pour la forme soluble de RAGE (esRAGE), est retrouvé augmenté mais sans augmentation de la protéine soluble au niveau plasmatique [215]. Chez l'Homme, les principaux variants de RAGE observés sont le RAGE « total », le variant 1 : le RAGE soluble endogène (esRAGE) où la partie intra cytoplasmique et transmembranaire sont tronquées, ainsi que le variant 2 (N-tronqué RAGE ou dominant négatif de RAGE) avec le domaine V tronqué.

4.3. Régulations post-traductionnelles

4.3.1 Glycosylation

Le récepteur RAGE possède deux sites de N-glycosylation au niveau de l'asparagine 25 et 81, respectivement. Ces glycosylations interviennent dans la liaison des ligands à RAGE [216]. De plus, il existe un polymorphisme de RAGE retrouvé chez l'homme induisant la substitution de la glycine en position 82 en sérine, favorisant la glycosylation de celle-ci et conduisant à une affinité plus importante des ligands à RAGE [217].

4.3.2 Clivage de RAGE

L'activation de RAGE est également contrôlée par un clivage protéolytique. Il a été montré que la MMP9 et *A Disintegrin and metalloproteinase 10* (ADAM 10) peuvent cliver la partie extracellulaire de RAGE formant une forme soluble de RAGE (sRAGE)

[218], [219]. L'augmentation de concentration en Ca^{2+} intracellulaire en calcium induit également le clivage de RAGE *via* l'activation de récepteur couplé aux protéines G (RCPG) [220], [221].

5. Signalisation

Le domaine cytoplasmique de RAGE ne possède pas d'activité tyrosine kinase, présupposant le recrutement de protéines adaptatives (Figure 20). Des études ont montré l'interaction de la *Diaphanous-related formin-1* (mDia-1) au domaine cytoplasmique de RAGE, permettant la signalisation cellulaire [222]. mDia-1 est une protéine riche en proline de la famille des formins, régulant l'endocytose et le cytosquelette d'actine. En interagissant avec RAGE, mDia-1 favorise l'activation de Rac-1 et Cdc42 induisant : la migration cellulaire [223], l'activation de la NADPH oxydase, et la formation d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) [224]. L'activation de la NADPH oxydase a été décrite comme une étape importante dans la signalisation de RAGE [225], [226].

De plus mDia-1 est capable d'interagir avec la *proto-oncogen tyrosine kinase* (c-Src) [227]. Il a été montré que l'activation de RAGE par le S100B induit l'activation de c-Src responsable de la cascade de phosphorylation *via* les *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) et le *phosphatidylinositol 3-kinase/Akt* [228], conduisant à l'activation de *signal transducers and activators of transcription 3* (STAT3) [229]. Cependant mDia-1 ne contrôle pas seule la signalisation de RAGE.

Suite à la liaison de son ligand, il a été observé que la sérine 391 de la partie cytoplasmique de RAGE était phosphorylée par une protéine kinase C (PKC), induisant l'affinité du *Toll-interleukin adaptor protein* (TIRAP) et du *Myeloid Differentiation primary response gene 88* (MyD88) sur celui-ci. Le recrutement de ces protéines adaptatrices induit également le recrutement de IRAK4, qui à son tour induit l'activation de la voie du PI3K/Akt, MAPK, conduisant à l'activation de NF- κ B [230].

L'activation des MAP kinases ERK 1/2 *via* RAGE a été retrouvée au niveau de plusieurs types cellulaires, parmi eux peuvent être cités les CMLv, les ostéoblastes ou les monocytes/macrophages [231], [232], [233]. L'utilisation de mutants de RAGE avec différentes délétions de la région cytoplasmique montre qu'elle peut se lier à ERK, grâce

à des séquences similaires au domaine D, suggérant une signalisation de ERK par l'interaction directe avec RAGE [234].

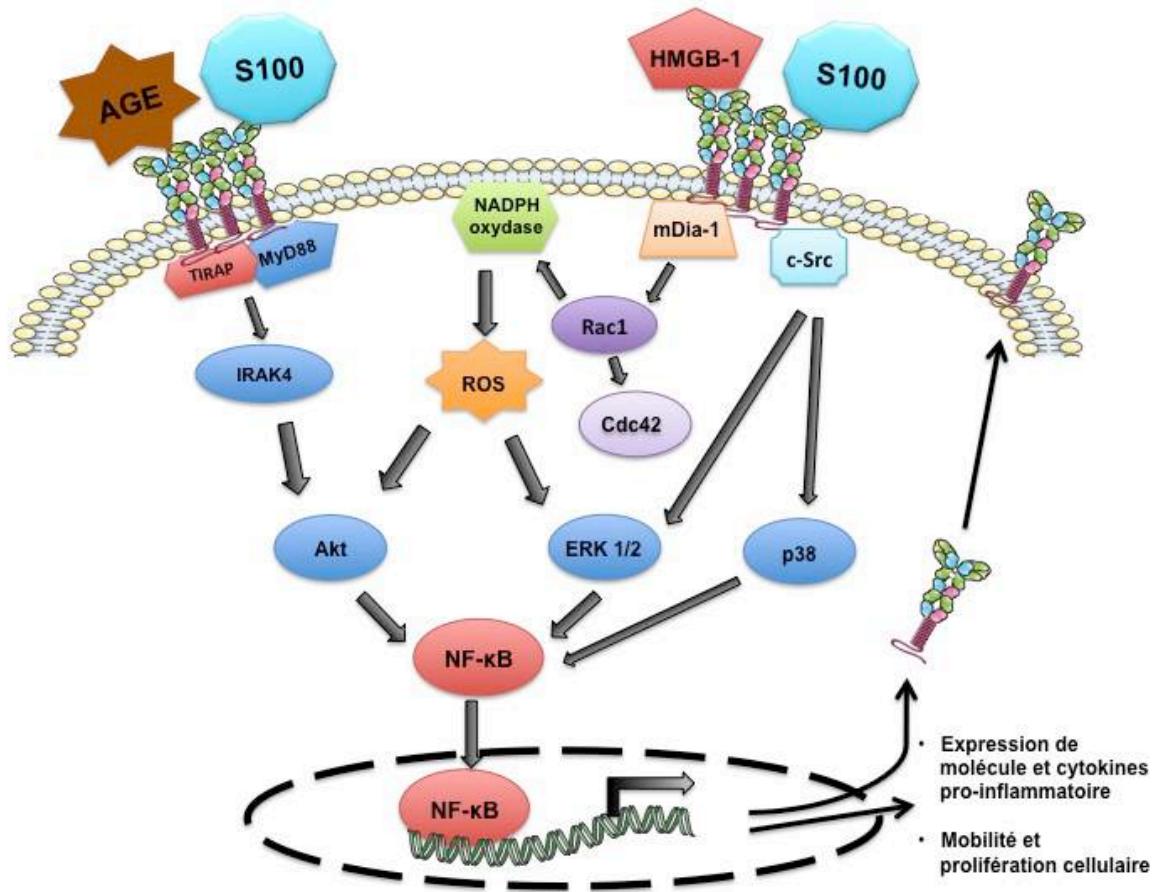


Figure 20 : Représentation schématique des principales voies de signalisation induites par RAGE.

La courte portion cytoplasmique de RAGE nécessite l'interaction avec des protéines adaptatrices telles que : TIRAP et MyD88 induisant l'activation de la voie PI3K/Akt, mDia-1 conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène via l'activation de la NADPH oxydase, ou encore le recrutement de c-Src favorisant l'activation de la MAPK p38 et de ERK 1 et 2. L'activation de ces différentes voies, ont pour principale conséquence, la translocation de NF-κB, permettant la synthèse de molécules pro-inflammatoires et l'expression d'autres RAGE.

6. Rôle de RAGE dans le remodelage vasculaire

6.1. Rôle dans l'athérosclérose et la thrombose

Grand nombre de preuves montrent la contribution de l'axe AGE-RAGE dans le développement et la progression de l'athérosclérose, principalement au cours du diabète. Tout d'abord les AGEs et les autres ligands de RAGE tels que les S100 ou HMGB1, s'accumulent au sein des plaques d'athérome [235], [236], [237]. De plus, une forte expression de RAGE est retrouvée au sein de plaque d'athérome provenant de patients diabétiques et est augmentée en fonction du degré de diabète. Cette expression de RAGE est principalement localisée au niveau des CMLv et des macrophages au niveau de la paroi vasculaire, et est également co-localisée avec les marqueurs du stress oxydatif [238]. Des études *in vivo*, utilisant des souris dyslipidémiques, déficientes pour l'apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}) rendues diabétiques, ont montré que RAGE induit la formation de plaques d'athérome [239], mais induit également leurs progression *via* la modulation de l'inflammation [240], [241]. L'administration de RAGE soluble réduit de manière significative la formation de plaque d'athérome, ainsi que des marqueurs de l'inflammation.

La dysfonction endothéliale est le premier évènement dans la formation de l'athérosclérose. Il a été montré que la biodisponibilité et l'activité du NO était réduite lorsqu'il y avait une augmentation des AGEs [242]. En effet l'activation de RAGE induit l'activation de la NADPH oxydase, conduisant à une élévation des ROS pouvant inhiber l'activité de la eNOS [243]. De plus, RAGE diminue la synthèse de PGI₂ et induit l'expression de l'endothéline-1 [244], [245]. RAGE induit également l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales, permettant le recrutement des cellules inflammatoires circulantes [171], [226], [246].

Au niveau des CMLv, RAGE induit d'une part l'expression de cytokines chimioattractantes telles que MCP-1, HMGB1, S100B et d'IL-6 [235], [247], d'autre part RAGE induit la migration, la prolifération et l'apoptose des CMLv [248], [249].

RAGE participe à la fragilité de la plaque d'athérome, conduisant à la formation d'un thrombus. En effet, il participe à l'orientation macrophagique favorisant la différenciation des macrophages en phénotype M1 [250], conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, à l'augmentation de la formation des cellules spumeuses

et à la sécrétion de métalloprotéases [10], [251]. De plus, l'activation de RAGE induit l'expression de molécules pro-thrombogènes tel que le facteur tissulaire au niveau des cellules endothéliales, des CMLv et des macrophages [252], [253], [254].

Le rôle de RAGE sur la fonction plaquettaire reste encore mal connu, en effet des études ont montré que les AGEs, les β amyloïdes et les protéines de la familles des S100 étaient capables d'induire une agrégation plaquettaire plus importante, en réponse à différents agonistes plaquettaires [255], [256], [257]. De plus, cette augmentation liée aux AGEs induit une augmentation de l'expression de RAGE à la surface plaquettaire [169]. Les AGEs sont également capables d'induire leur phénotype pro-thrombotique en interagissant avec le CD36, qui est fortement exprimé à la surface plaquettaire [258].

6.2. Rôle dans les calcifications vasculaires

Plusieurs études ont démontré l'implication des AGEs et de RAGE dans la formation de CV. En effet, *in vitro*, l'exposition d'AGEs, induit une ostéodifférenciation des CMLv, caractérisée par un dépôt de calcium et la formation de MEC. Cet effet nécessite l'interaction des AGEs avec RAGE, puisque l'utilisation d'anticorps bloquants, inhibe la formation de calcification [259], [260]. Il a été montré que l'activation de la voie ERK 1/2 et de la MAPK p38, ainsi que l'activation de la NADPH oxydase sont dépendantes de la transformation des CMLv via l'activation de RAGE [260], [261], [262]. Dans un modèle de rat diabétique, il a été montré que la réduction du taux d'AGEs à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, réduit la calcification induit par le diabète [263], [264].

VII. Toxines urémiques

Selon le groupe de travail européen sur les toxines urémiques (EUTOX), une toxine urémique est une substance chimique ou biologique identifiée et quantifiable, qui serait normalement excrétée par les reins et retrouvée élevée chez les patients urémiques. La concentration élevée de cette substance est la conséquence d'un dysfonctionnement physiologique qui disparaît lorsque la concentration diminue. Des études *in vivo* ou *in vitro* doivent permettre de prouver son activité biologique [265], [266].

Les toxines urémiques sont souvent regroupées en trois groupes (Tableau 3) :

- Les petites molécules hydrosolubles
- Les molécules liées aux protéines
- Les moyennes molécules avec un poids moléculaire > 500 Da

Small water soluble solutes	Protein-bound solutes	Middle molecules
Asymmetric dimethylarginine	3-Deoxyglucosone	Adrenomedullin
Benzylalcohol	CMPF	Atrial natriuretic peptide
β -Guanidinopropionic acid	Fructoselysine	β_2 -Microglobulin
β -Lipotropin	Glyoxal	β -Endorphin
Creatinine	Hippuric acid	Cholecystokinin
Cytidine	Homocysteine	Clara cell protein
Guanidine	Hydroquinone	Complement factor D
Guanidinoacetic acid	Indole-3-acetic acid	Cystatin C
Guanidinosuccinic acid	Indoxyl sulfate	Degranulation inhibiting protein I
Hypoxanthine	Kinurenine	Delta-sleep-inducing peptide
Malondialdehyde	Kynurenic acid	Endothelin
Methylguanidine	Methylglyoxal	Hyaluronic acid
Myoinositol	N-carboxymethyllysine	Interleukin 1 β
Orotic acid	P-cresol	Interleukin 6
Orotidine	Pentosidine	Kappa-Ig light chain
Oxalate	Phenol	Lambda-Ig light chain
Pseudouridine	P-OHhippuric acid	Leptin
Symmetric dimethylarginine	Quinolinic acid	Methionine-enkephalin
Urea	Spermidine	Neuropeptide Y
Uric acid	Spermine	Parathyroid hormone
Xanthine		Retinol binding protein
		Tumor necrosis factor alpha

Tableau 3 : Représentation des principales toxines retrouvées au cours de l'IRC

Dans cette liste de toxines urémiques les plus connues, une grande proportion sont des produits de glycation avancée ou des produits intermédiaires de la glycation. Les reins participent à l'épuration des AGEs, il a été montré que le niveau de protéine glyquée est corrélé avec la concentration plasmatique en créatinine [267], en effet, les AGEs sont filtrés par le glomérule rénal, réabsorbé par le tubule proximal afin d'être dégradé ou modifié puis excrété par les urines [268], [269]. De plus, la concentration sérique d'autres ligands de RAGE est également augmentée au cours de l'IRC comme pour la S100A12 [270], la SAA [271] ainsi que HMGB-1 [272]. Il a été montré que cette accumulation des AGEs et des ligands de RAGE au cours de l'IRC est associée à une augmentation des complications cardiovasculaires [273], [274], [275].

Le rôle délétère de RAGE au niveau de la paroi vasculaire ainsi que l'accumulation de ces ligands au cours de l'IRC, font de ce récepteur une piste intéressante d'étude au cours du développement de la vasculopathie urémique.

VIII. Hypothèses de travail

Nous savons que l'accumulation des AGEs et des ligands de RAGE est retrouvée dans certaines pathologies comme le diabète, participant au remodelage de la paroi vasculaire. En effet, chez des souris ApoE^{-/-} diabétiques, il a été mis en évidence que l'expression de RAGE et de ses ligands était augmentée et que la formation de la plaque d'athérome était significativement réduite lorsque ces souris étaient délétées pour RAGE [171].

L'IRC induit un vieillissement accéléré des vaisseaux et augmente considérablement le risque de complications cardiovasculaires regroupant l'athérosclérose, la calcification vasculaire et la thrombose artérielle. Au cours de l'IRC, les AGEs et les ligands de RAGE ne sont plus épurés par les reins et sont également accumulés et interagissent avec RAGE. Il a été montré dans un modèle murin d'IRC, que l'utilisation d'anticorps bloquant RAGE, diminuait l'apparition de plaque d'athérome [276].

Nous avons émis l'hypothèse que l'interaction des AGEs et des ligands de RAGE avec leur récepteur RAGE, pouvait être responsable d'un signal pro-inflammatoire et pouvait participer au développement de la vasculopathie urémique. Pour cela nous avons utilisé un modèle de souris urémique, par néphrectomie au 5/6^e et des animaux invalidés ou non pour RAGE, avec pour objectifs d'étudier :

- La cinétique d'accumulation d'un ligand de RAGE, la sérum amyloïde A, ainsi que son rôle dans le développement des plaques d'athérome après l'induction d'une IRC. Mais également d'étudier l'axe SAA-RAGE sur la migration des cellules musculaires lisses.
- L'implication de RAGE sur l'apparition de calcifications vasculaires *in vivo* au cours de l'IRC. Mais également observer les marqueurs d'ostéo-différenciation *in vitro* des CMLv stimulées ou non par des ligands de RAGE et du Pi (molécule pro-calcifiante).
- Le rôle de l'axe AGE-RAGE dans le processus de thrombose urémique *in vivo*, par induction d'une lésion carotidienne induite par le perchlorure de fer. Suivi de l'étude de la fonction plaquettaire *ex vivo*.

Chapitre II : Résultats

Article 1 :

Signaling of Serum Amyloid A Through Receptor for Advanced Glycation End Products as a Possible Mechanism for Uremia-Related Atherosclerosis

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2016;36:800-809

Belmokhtar K, Robert T, Ortillon J, Braconnier A, Vuillet V, Boulagnon-Rombi C, Diebold MD, Pietrement C, Schmidt AM, Rieu P, Toure F

Les complications cardiovasculaires sont les principales causes de décès des patients atteints d'insuffisance rénale chronique. Ces patients ont un risque de faire un évènement cardiovasculaire 10 à 20 fois supérieur par rapport à la population générale. Ces complications sont caractérisées par des modifications artérielles importantes regroupées sous le terme de vasculopathie urémique. L'IRC est responsable de la formation accélérée de plaques d'athérome, mais également d'une augmentation de la sévérité de celles-ci. En effet il a été montré une corrélation importante entre la diminution du DFG et la sévérité des plaques d'athérome [108].

De plus en plus d'études montrent l'implication des toxines urémiques dans l'apparition de l'athérosclérose au cours de l'IRC. Ces toxines sont des solutés s'accumulant dans l'organisme des patients urémiques. Elles peuvent participer à dysfonction endothéliale ainsi qu'à inflammation de la paroi artérielle des patients IRC. Parmi ces toxines, la sérum amyloïde A (SAA) est une protéine de la phase aigüe de l'inflammation, majoritairement produite par le foie, et son taux est fortement augmenté au cours de l'IRC [271]. La SAA est impliquée dans la progression de l'athérosclérose [277] chez le sujet non IRC.

Plusieurs publications ont rapporté un lien entre le rôle pathologique de la SAA et son interaction avec RAGE. Dans un modèle murin d'amyloïdose systémique, le blocage de RAGE diminue les dépôts amyloïdes au niveau de la rate. Egalement, la SAA induit une génération de facteur tissulaire dépendante l'activation de RAGE [254], [278].

Ainsi nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation sérique de la SAA et son interaction avec RAGE participent à la formation des plaques d'athérome au cours de l'IRC.

Pour répondre à cette hypothèse, dans ce premier article (pages 82-99), nous avons dans un premier temps utilisé une approche *in vivo*, à l'aide d'un modèle murin de vasculopathie urémique dans le fond génétique C57/Bl6 ApoE^{-/-} et ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}. L'insuffisance rénale chronique a été induite par une néphrectomie des 5/6^{ème}, des animaux n'ayant pas subi de néphrectomies ont été utilisés comme contrôle. Après 12 semaines d'IRC, les animaux ont été sacrifiés, le sérum ainsi que les valves et crosses

aortiques ont été prélevés afin d'étudier la cinétique d'accumulation de la SAA au niveau sérique et tissulaire parallèlement à l'étude de l'apparition des plaques d'athérome.

A l'aide de cette approche, nous avons observé que la surface des lésions athérosclérotiques chez les souris ApoE^{-/-} rendues urémiques étaient significativement plus importantes que chez les souris non-urémiques et que, la délétion de RAGE protégeait de l' augmentation des lésions athérosclérotiques induites par l'IRC.

Nous avons également observé une augmentation de la transcription de RAGE six fois plus importante au niveau des aortes de souris ApoE^{-/-} urémiques comparée aux contrôles. Parallèlement aux modifications vasculaires, nous avons observé une accumulation sérique de la SAA au cours de l'IRC.

Des études immunohistochimiques au niveau de la crosse aortique ont, par la suite, montré un marquage intense de RAGE et de la SAA au sein de la paroi vasculaire athérosclérotique chez les souris urémiques. Chez ces souris, la présence importante de marquage pour l' α -SMA (*alpha-Smooth Muscle Actin*) au niveau de la chape fibreuse suggère une migration importante des CMLv au court de l'IRC.

Ces résultats in vivo ont montré après 12 semaines d'IRC une augmentation significative de la surface des lésions athéromateuses parallèlement à une augmentation d'expression de RAGE et de la SAA au niveau des CMLv de la chape fibreuse. Il a également été observé que la délétion de RAGE protégeait de la formation des plaques d'athéromes induite par l'urémie. Nous émettons donc l'hypothèse que l'interaction SAA-RAGE induit une signalisation pro-migratoire des CMLv.

Dans la suite de l'étude, nous nous sommes intéressés au rôle de la SAA et son interaction avec RAGE sur la migration des CMLv. Pour cela, nous avons utilisé des CMLv primaires isolées à partir d'aorte de souris C57/Bl6 délétées ou non pour RAGE.

- Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si la SAA induisait une signalisation RAGE dépendante. Pour cela, nous avons stimulé des CMLv avec de la SAA mais également avec du S100B (ligand connu de RAGE), et nous avons comparé la signalisation induite par la SAA avec celle induite avec le S100B. La présence de SAA et de S100B induit la phosphorylation de AKT et de ERK 1/2 de

manière RAGE dépendante.

Puis nous avons analysé la production de dérivés réactifs de l'oxygène à l'aide d'une sonde fluorogénique permettant de mesurer le stress oxydatif. Nous avons retrouvé une augmentation significative de la formation des espèces réactives de l'oxygène au niveau des CMLv en présence de SAA et de S100B et que la délétion de RAGE protégeait de cette formation induite par ces ligands.

- Dans un second temps, nous avons voulu savoir si cette signalisation de la SAA dépendante de RAGE induisait la migration des CMLv. Pour cela, nous avons effectué des expériences de migration cellulaire dans des modèles de « *wound healing assay* » , mais également en chambre de Boyden. Avec ces deux méthodes, la présence de SAA et de S100B induisait une augmentation significative de la migration des CMLv et la délétion de RAGE réduisait cette migration induite par la SAA et le S100B. De plus, l'inhibition de la production des espèces réactives de l'oxygène induite par la N-acétyl cystéine, inhibait significativement la phosphorylation de AKT ainsi que la migration des CMLv.

Les expériences mis en œuvre lors des révisions du manuscrit ont permis de confirmer ce phénomène au niveau de CMLv humaines, montrant cependant que dans ce type cellulaire et contrairement aux cellules murines, les espèces réactives de l'oxygène induisait la phosphorylation de ERK 1/2 , plutôt que celle d'AKT.

Ces résultats in vitro, ont permis d'expliquer que la présence importante des CMLv observée précédemment in vivo pourrait être induite par la migration de ces dernières suite à l'activation d'une signalisation dépendante de RAGE via son interaction avec la SAA.

L'ensemble de ce premier travail a permis de démontrer pour la première fois que le rôle pro-athérogène de la SAA au cours de l'IRC pourrait être médié par l'activation de RAGE. Cet effet semble impliquer la migration des cellules musculaires lisses, dépendant de l'activation de RAGE.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Signaling of Serum Amyloid A Through Receptor for Advanced Glycation End Products as a Possible Mechanism for Uremia-Related Atherosclerosis

Karim Belmokhtar, Thomas Robert, Jeremy Ortillon, Antoine Braconnier, Vincent Vuiblet, Camille Boulagnon-Rombi, Marie Danièle Diebold, Christine Pietrement, Ann Marie Schmidt, Philippe Rieu and Fatouma Touré

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016;36:800-809; originally published online March 17, 2016;
doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306349

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2016 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/36/5/800>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2016/03/16/ATVBAHA.115.306349.DC1>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer document](#).

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:
<http://atvb.ahajournals.org//subscriptions/>

Signaling of Serum Amyloid A Through Receptor for Advanced Glycation End Products as a Possible Mechanism for Uremia-Related Atherosclerosis

Karim Belmokhtar, Thomas Robert, Jeremy Ortillon, Antoine Braconnier, Vincent Vuiblet, Camille Boulagnon-Rombi, Marie Danièle Diebold, Christine Pietrement, Ann Marie Schmidt, Philippe Rieu, Fatouma Touré

Objective—Cardiovascular disease is the leading cause of death in patients with end-stage renal disease. Serum amyloid A (SAA) is an acute phase protein and a binding partner for the multiligand receptor for advanced glycation end products (RAGE). We investigated the role of the interaction between SAA and RAGE in uremia-related atherogenesis.

Approach and Results—We used a mouse model of uremic vasculopathy, induced by 5 of 6 nephrectomy in the *Apoe*^{-/-} background. Sham-operated mice were used as controls. Primary cultures of *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} vascular smooth muscle cells (VSMCs) were stimulated with recombinant SAA, S100B, or vehicle alone. Relevance to human disease was assessed with human VSMCs. The surface area of atherosclerotic lesions at the aortic roots was larger in uremic *Apoe*^{-/-} than in sham-operated *Apoe*^{-/-} mice ($P<0.001$). Furthermore, atherosclerotic lesions displayed intense immunostaining for RAGE and SAA, with a pattern similar to that of α -SMA. *Ager* transcript levels in the aorta were 6 \times higher in uremic animals than in controls ($P<0.0001$). Serum SAA concentrations were higher in uremic mice, not only after 4 weeks of uremia but also at 8 and 12 weeks of uremia, than in sham-operated animals. We investigated the functional role of RAGE in uremia-induced atherosclerosis further, in animals lacking RAGE. We found that the induction of uremia in *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} mice did not accelerate atherosclerosis. In vitro, the stimulation of *Ager*^{+/+} but not of *Ager*^{-/-} VSMCs with SAA or S100B significantly induced the production of reactive oxygen species, the phosphorylation of AKT and mitogen-activated protein kinase-extracellular signal-regulated kinases and cell migration. Reactive oxygen species inhibition with N-acetyl cysteine significantly inhibited both the phosphorylation of AKT and the migration of VSMCs. Similar results were obtained for human VSMCs, except that the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase-extracellular signal-regulated kinases, rather than of AKT, was subject to specific redox-regulation by SAA and S100B. Furthermore, human aortic atherosclerotic sections were positively stained for RAGE and SAA.

Conclusions—Uremia upregulates SAA and RAGE expression in the aortic wall and in atherosclerotic lesions in mice. *Ager*^{-/-} animals are protected against the uremia-induced acceleration of atherosclerosis. SAA modulates the functions of murine and human VSMCs in vitro in a RAGE-dependent manner. This study, therefore, identifies SAA as a potential new uremic toxin involved in uremia-related atherosclerosis through interaction with RAGE. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:800-809. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306349.)

Key Words: cardiovascular diseases ■ mice ■ nephrectomy ■ receptor for advanced glycation end products (RAGE) ■ serum amyloid a protein

Cardiovascular disease is the leading cause of death in patients with end-stage renal disease. Uremic patients have a 10 \times to 20 \times higher risk of cardiovascular disease-related death than individuals from the general population.¹ Uremic vasculopathy is characterized by extensive atherosclerosis and arteriosclerotic lesions.² Arterial calcifications of the medial part of vessels are the main feature of the

arteriosclerotic lesions. These calcifications are now known to result from an active smooth muscle cell-dependent mineralization process.³⁻⁵

Serum amyloid A (SAA) proteins constitute a family of acute phase proteins synthesized by the liver in response to cytokines.⁶ Serum SAA levels are high in individuals at high risk of cardiovascular disease, suggesting that SAA is a

Received on: August 3, 2015; final version accepted on: February 29, 2016.

From the UFR Médecine, Laboratoire de néphrologie, Faculté de Médecine, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 7369 (Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, MEDyC), Reims, France (K.B., T.R., J.O., V.V., M.D.D., C.P., P.R., F.T.); Division of Nephrology (T.R., A.B., V.V., P.R., F.T.), Division of Anatomopathology (C.B.-R., M.D.D.), and Division of Pediatrics (C.P.), CHU Reims, Reims, France; and Diabetes Research Program, New York University, New York (A.M.S.).

This manuscript was sent to Ryozo Nagai, Consulting Editor, for review by expert referees, editorial decision, and final disposition.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.115.306349/-DC1>. Correspondence to Fatouma Touré, MD, PhD, Division of Nephrology and URCA CNRS UMR 7369, Hôpital Maison Blanche, 45 Rue Cognacq-Jay, 51100 Reims, France. E-mail ftoure@chu-reims.fr

© 2016 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306349

Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
SAA	serum amyloid A
VSMC	vascular smooth muscle cells
RAGE	receptor for advanced glycation end products
CVD	cardiovascular disease
HDL	high-density lipoprotein
NAC	N-acetyl cysteine
ROS	reactive oxygen species

marker of cardiovascular risk.⁶ High levels have been reported in uremic patients and are independently associated with cardiovascular mortality.⁷ SAA has also been reported to play an active role in the atherogenic process.^{6,8,9} First, SAA has been detected in the atherosclerotic lesions of hyperlipidemic animals and is produced in situ by vascular cells involved in atherosclerosis, such as endothelial cells, smooth muscle cells, and adipocytes.^{7,10} Second, SAA modulates the function of cultured monocytes and macrophages.^{11–13} Toll-like receptors (2 and 4) and the scavenger receptor CD36 have been reported to mediate the effect of SAA in vitro, depending on cell type.^{14,15} Receptor for advanced glycation end products (RAGE) has also been identified as a binding partner for SAA.^{7,12,16–18}

RAGE is a cell surface receptor of the immunoglobulin superfamily involved in important processes, such as cell migration, adhesion, and proliferation.^{19–22} RAGE was first described as a binding partner for AGEs^{23,24}; however, proteins from the S100 family, amyloid fibrils, high mobility group box 1, C3a, and CpG DNA oligonucleotides can trigger a proinflammatory response via RAGE.²⁰ RAGE signaling is, therefore, involved in the pathogenesis of several diseases, including diabetes mellitus, cancer, autoimmune disorders, neurodegenerative and vascular diseases.^{17,18,20,22,25,26}

RAGE signaling has been implicated in uremia-induced atherosclerosis.^{27,28} Indeed, in uremic vasculopathy, in addition to the typical risk factors for cardiovascular disease, vascular changes also involve factors related to uremia, such as anemia, hyperphosphatemia, or the accumulation of cytotoxic molecules called uremic toxins.^{1,2,29} Some of these uremic toxins, such as advanced glycation end products and the S100 family of proteins, exert their effects through interaction with RAGE.^{30,31}

Given the strong involvement of RAGE signaling in atherosclerosis and the independent association of high serum levels in uremic patients with cardiovascular mortality, we investigated whether SAA acted as a uremic toxin modulating important smooth muscle cell-dependent disturbances in uremia-related atherosclerosis through interaction with RAGE.

Methods

Materials and Methods are available in the online-only Data Supplement.

Results

Uremia Promotes Atherosclerotic Lesions and the Phosphorylation of AKT and MAPK-ERK

We used a previously described mouse model of uremic vasculopathy to analyze the effect of uremia on atherosclerosis

and on important signaling pathways. *Apoe^{-/-}* mice were sham operated or subjected to 5 of 6 nephrectomy to induce uremia.^{32,33} Twelve weeks after surgery, serum, heart valves, and aortas were retrieved from the 2 groups of animals. Serum was used to analyze biochemical variables (Table). Aorta roots were stained with Oil Red O to measure the surface area of atherosclerotic lesions (Figure 1A), and aortas were analyzed by Western blotting (Figure 1B).

Consistent with previous studies using the same model of uremic vasculopathy, serum concentrations of total cholesterol and triglycerides were significantly higher in uremic than in sham-operated mice. Uremia also promoted the accumulation of calcium and phosphate in serum (Table). Furthermore, we confirmed that the surface area of aorta root atherosclerotic lesions was significantly larger in uremic than in sham-operated animals: 54±4.6% versus 30±4.54%, respectively, $P<0.001$ (Figure 1A). We then analyzed the effect of uremia on the aortic phosphorylation of AKT and MAP-kinase ERK. Interestingly, we found that in uremic mice, the phosphorylation levels of both AKT and ERK were twice those in sham-operated mice ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively; Figure 1B).

Uremia Promotes the Expression of SAA and RAGE

We then measured serum concentrations of SAA protein in sham-operated and uremic mice. Circulating levels of SAA were significantly higher in uremic than in sham-operated animals. Four weeks after surgery, uremic animals had mean serum SAA concentration of 436.3±38 versus 4.8±1.6 µg/mL for sham-operated animals ($P<0.0001$). Twelve weeks after surgery, serum SAA concentrations in uremic animals were lower than those at the 4-week time point, but remained significantly higher in uremic mice than in sham-operated controls (26.2±6.9 versus 11.79±5.72 µg/mL, respectively; $P<0.005$; Figure 1C).

Given the involvement of RAGE signaling in the atherosclerotic process, we measured *Ager* mRNA levels in aortas retrieved from sham-operated and uremic mice. *Ager* transcript levels were almost 6x higher in uremic than in sham-operated mice ($P<0.0001$; Figure 1D).

For confirmation of the upregulation of *Ager* expression in uremic mice and to analyze the abundance of the SAA protein, we performed immunostaining on aortic arches retrieved from sham-operated and uremic mice. SAA staining was stronger in aortas from uremic mice than in those from control mice. In particular, staining for SAA was intense in the vessel wall and in atherosclerotic plaques (Figure 2). Immunostaining for RAGE was also stronger in aortic tissue from uremic mice than in vessels from control animals. Interestingly, the pattern of staining

Table. Differences in Serum Biochemical Variables Between Uremic and Sham-Operated *Apoe^{-/-}* Mice

	Sham (n=7)	Uremic (n=6)	P Value
Urea, mmol/L	7.27±0.85	23.3±1.06	<0.00002
Calcium, mmol/L	2.08±0.03	2.41±0.08	<0.0003
Phosphorus, mmol/L	1.78±0.13	1.95±0.10	<0.05
Cholesterol, mmol/L	6.89±0.76	10.81±1.16	<0.001
Triglycerides, mmol/L	0.74±0.14	1.80±0.49	<0.008

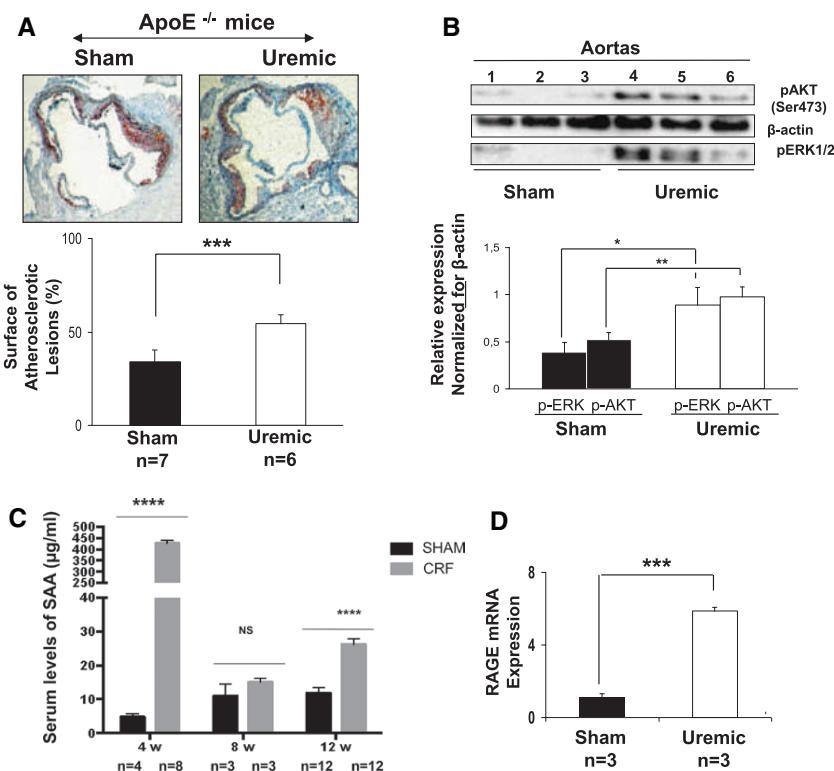


Figure 1. Uremia promotes the formation of atherosclerotic lesions and the expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and serum amyloid A (SAA). **A**, Representative photomicrographs ($\times 200$) showing the pattern of neutral lipid accumulation in the aortic valve as assessed by Oil-Red-O staining in sham-operated (left) and uremic (right) ApoE^{-/-} mice. The ventricular edge and ≈ 1 mm of the aortic root were immediately dissected under the microscope and cryomounted in optimal cutting temperature embedding medium. Cryosections, cut in 7- μ m-thick slices, were collected and numbered from the appearance of the first cusps (point 0); sections at 200-, 400-, 600-, and 800- μ m distances from the cusps were stained with red oil O and mounted under coverslip 2. Results are expressed as the ratio between the area of the lesion and the total area of the aortic valve (%). **B**, Proteins were extracted from the aortas of sham-operated (n=3, lane 1–3) and uremic (n=3, lane 4–6) ApoE^{-/-} mice and were analyzed by immunoblotting using anti-pAKT (ser 473) and anti-pERK1/2 antibodies. Results are all expressed as the mean \pm SEM. **C**, Sera were collected from sham-operated and uremic ApoE^{-/-} mice at 4, 8, or 12 weeks after surgery; and the concentration of SAA was determined by ELISA. **D**, Aortas were collected to analyze levels of RAGE mRNA in sham-operated (n=3) and uremic (n=3) ApoE^{-/-} mice. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001, ****P<0.0001. CRF indicates chronic renal failure; and NS, nonsignificant.

for α -SMA differed between control and uremic tissues. Uremic tissues were positively stained for α -SMA at the fibrous cap at the periphery of the atherosclerotic lesion, suggesting that this fibrous cap was formed by migrating vascular smooth muscle cells (VSMCs). Furthermore, the periphery of the lesion also stained positive for RAGE and SAA, suggesting that these proteins were also involved in the uremic atherosclerotic process.

These results suggest that uremia is associated with an acceleration of atherosclerosis and high levels of both the SAA and the RAGE proteins in atherosclerotic lesions. Furthermore, uremia induces high levels of circulating SAA and the phosphorylation of MAPK ERK and AKT in the aorta.

RAGE Deletion Protects Against the Uremia-Mediated Acceleration of Atherosclerosis

We analyzed the functional role of RAGE in vivo further, by subjecting *Apoe^{-/-} Ager^{-/-}* mice to sham surgery or 5 of 6 nephrectomy, and then comparing the surface areas of the atherosclerotic lesions in the 2 groups of animals. The areas covered by atherosclerotic lesions did not differ significantly between sham-operated (n=5) and uremic (n=5)

Apoe^{-/-} Ager^{-/-} mice ($15.8 \pm 8.2\%$ and $18.5 \pm 7.8\%$, respectively; Figure 3). This suggests that the upregulation of RAGE mRNA and protein levels during uremia is involved in the acceleration of atherosclerosis.

SAA Signals Through RAGE

We hypothesized that the interaction of circulating lipid-free SAA with RAGE expressed on the surface of VSMCs was involved in the uremic atherosclerotic process. We explored the effect of SAA on the functions of primary VSMCs, by investigating the activation of signaling pathways and the production of reactive oxygen species (ROS) in these cells in vitro. We compared the effect of SAA with that of a well-known ligand of RAGE, S100B. We also used *Ager^{-/-}* VSMCs to analyze the involvement of RAGE in the effects mediated by SAA.

We stimulated primary cultures of *Ager^{+/+}* and *Ager^{-/-}* VSMCs with exogenous recombinant SAA (200 ng/mL), S100B (20 μ g/mL), or vehicle alone and analyzed intracellular signaling. Consistent with previous reports,¹⁸ AKT and MAP kinase ERK were phosphorylated in response to S100B stimulation

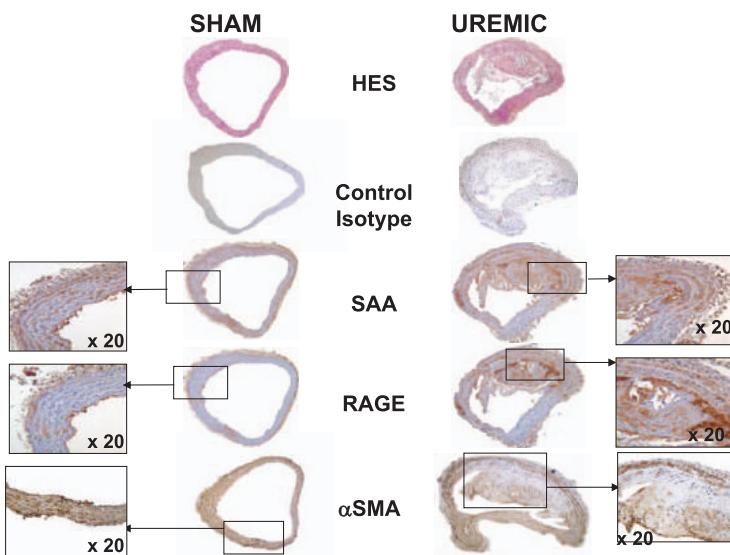


Figure 2. Uremia promotes the accumulation of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and serum amyloid A (SAA) protein. Representative sections of aortic arches of sham-operated ($n=3$) and uremic ($n=3$) $\text{ApoE}^{-/-}$ mice. Sections were stained with hematoxylin–eosin–safran (HES) and immunostained with isotype control or with antibodies against SAA, RAGE, and smooth muscle α -actin (α SMA). SAA, RAGE, and α SMA are highly expressed in the atherosclerotic area of aortic arch of uremic mice (magnification, $\times 20$).

in $Ager^{+/+}$ cells. Interestingly, stimulation with SAA induced the intense, rapid, and transient phosphorylation of AKT on Ser473. Mitogen-activated protein kinase-extracellular signal-regulated kinases (MAPK-ERK) was also phosphorylated, albeit to a lesser extent, in $Ager^{+/+}$ cells in response to SAA. By contrast, stimulation of $Ager^{-/-}$ cells with either SAA or S100B had no effect on intracellular signaling (Figure 4A–4D).

We then measured the production of ROS, using a fluorescent probe (Figure 4E). The stimulation of $Ager^{+/+}$ cells with SAA or S100B resulted in significant production, with mean values of 25.84 ± 0.52 AU for SAA, 44.68 ± 18.2 AU for S100B, and 6.01 ± 0.007 AU for the control ($P < 0.0001$ for SAA and S100B versus control). However, neither SAA nor S100B stimulated the production of ROS in $Ager^{-/-}$ cells: the mean values were 0.001 ± 0.003 AU for SAA, 0.05 ± 0.35 AU for S100B, and 0.05 ± 0.02 AU for the control.

These results suggest that the stimulation of VSMCs with SAA induces RAGE-dependent intracellular signaling, leading to the production of ROS.

SAA Stimulates the RAGE-Dependent Migration of VSMCs

The migration of VSMCs is an important step in the development of atherosclerotic lesions. Therefore, we studied the migration of VSMCs after their stimulation with SAA or S100B (Figure 5).

We used a wound healing migration assay and found that stimulation of $Ager^{+/+}$ cells with SAA (200 ng/mL) or with S100B (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hours significantly promoted the migration of these cells: the numbers of migrating cells were 117 ± 11 for the control, 537 ± 6 in response to SAA ($P < 0.01$), and 312 ± 6 in response to S100B ($P < 0.001$). However, these effectors did not significantly induce the migration of $Ager^{-/-}$ cells (Figure 5A and 5B).

For confirmation of these results, we evaluated the migration of $Ager^{+/+}$ and $Ager^{-/-}$ VSMCs in chemotactic chambers. We studied migration toward SAA, S100B, and 20% FBS as a positive control. Both cell types migrated strongly and to a

similar extent toward FBS (Figure 5C). The stimulation of $Ager^{+/+}$ primary VSMCs with SAA (200 ng/mL) or S100B (20 $\mu\text{g}/\text{L}$) significantly induced the time-dependent chemotactic migration of these cells. Optical densities, reflecting the number of migrated cells, after 24 hours of incubation were 2.36 ± 0.14 AU for SAA, 1.83 ± 0.15 AU for S100B, and 0.96 ± 0.26 AU for control media ($P < 0.001$ for SAA and S100B versus control; Figure 5C). However, the stimulation of $Ager^{-/-}$ VSMCs with SAA or S100B did not significantly induce the migration of these cells. Indeed, the optical density after 8 hours of stimulation was 0.71 ± 0.09 AU for SAA, 0.67 ± 0.02 AU for S100B, and 0.79 ± 0.15 AU for control media (nonsignificant) (Figure 5C).

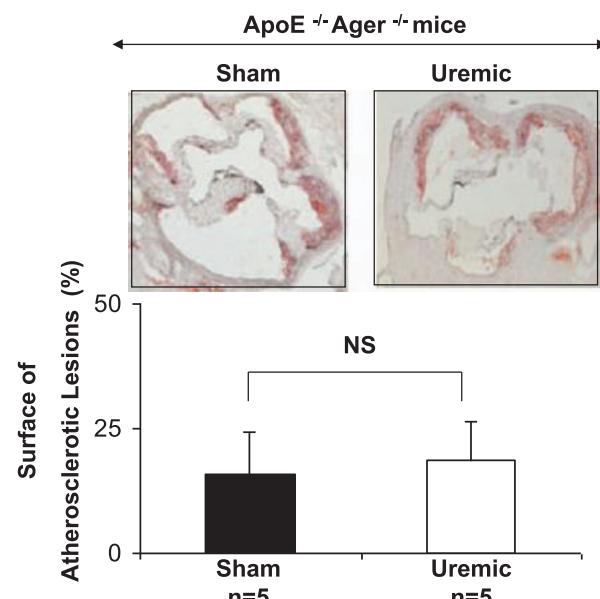


Figure 3. Invalidation of receptor for advanced glycation end products (RAGE) protects from uremia-mediated acceleration of atherosclerosis. Representative photomicrographs ($\times 200$) showing the pattern of neutral lipid accumulation in the aortic valve as assessed by Oil-Red-O staining in sham-operated (left) and uremic (right) $\text{ApoE}^{-/-}\text{-Ager}^{-/-}$ mice. Results are expressed as the ratio between the area of the lesion and the total area of the aortic valve. NS indicates nonsignificant.

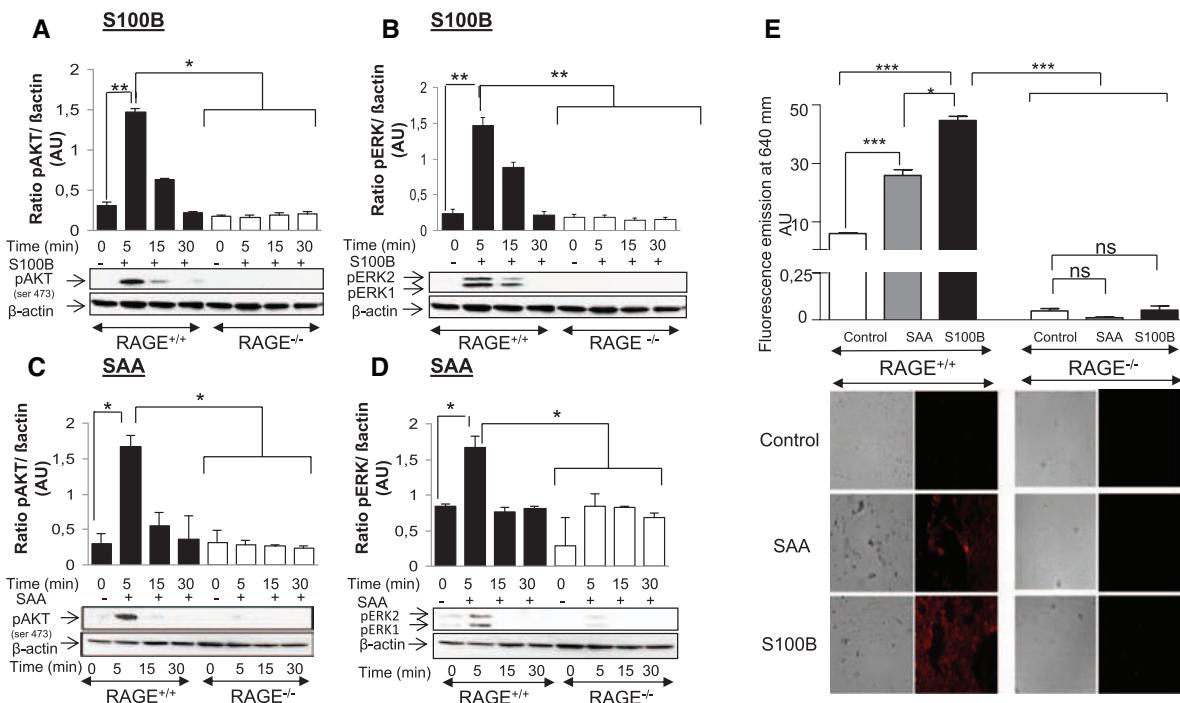


Figure 4. Serum amyloid A (SAA) induces the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-dependent production of reactive oxygen species (ROS) and promotes intracellular signaling in vascular smooth muscle cells (VSMCs). RAGE^{+/+} and RAGE^{-/-} VSMCs were exposed to a RAGE-specific ligand S100B at 20 µg/mL or SAA at 200 ng/mL for 5, 15, or 30 minutes, and then harvested to examine the phosphorylation of AKT (pAKT; S473) and ERK1/2 (pERK1/2; Thr202/Tyr204). Representative bar graphs at each time point showing the abundance of pAKT and pERK1/2 protein normalized to that of β-actin in RAGE^{+/+} and RAGE^{-/-} VSMCs exposed to S100B (**A** and **B**) or to SAA (**C** and **D**). Results are expressed as the mean±SEM (n=3 independent experiments). *P<0.05; **P<0.01 vs control VSMCs. **E**, ROS generation was measured using the CellROX Deep Red Reagent fluorescent probe. VSMCs were treated with S100B (20 µg/mL) or SAA (200 ng/mL) for 30 min in the presence of the fluorescent dye. Results are expressed as the mean±SEM; n=3 independent experiments *P<0.05; ***P<0.001. NS indicates nonsignificant.

We then analyzed cell proliferation (Figure 5D). We cultured VSMCs in the same conditions used for the migration assay. Neither SAA nor S100B induced the proliferation of *Ager*^{+/+} or *Ager*^{-/-} cells, as shown by comparisons with control cells. Incubation with 20% for 48 hours significantly stimulated proliferation in both *Ager*^{+/+} (531±115% of control; P<0.001) and *Ager*^{-/-} cells (405±62.3% of control; P<0.001; Figure 5D).

These results suggest that SAA stimulates the migration of VSMCs via RAGE but has no effect on cellular proliferation.

SAA Controls VSMC Migration Through RAGE-Mediated Oxidative Stress

RAGE is a potent inducer of oxidative stress. Indeed, we previously reported that the migration of VSMCs in response to S100B-RAGE depends on the activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase.³⁴ We therefore investigated whether the SAA-RAGE-mediated migration of VSMCs was linked to redox regulation (Figure 6).

We treated cells with 10 nmol/L N-acetyl cysteine (NAC) and analyzed ROS production after stimulation with SAA or S100B. NAC significantly inhibited ROS production in response to SAA (23±0.49 AU in the absence of NAC versus 8.46±0.13 AU in the presence of NAC; P<0.001) or S100B (25.7±0.28 in the absence of NAC versus 8.6±0.12 in the presence of NAC; P<0.001). We then analyzed the signaling pathways induced by SAA and S100B. NAC significantly inhibited

the phosphorylation of AKT on ser473 in cells stimulated with SAA or S100B, but had no effect on the phosphorylation of MAPK-ERK. Finally, we investigated the effect of inhibiting oxidative stress on the migration of VSMCs in response to SAA or S100B. NAC significantly inhibited the migration of VSMCs stimulated with SAA or S100B. Indeed, the number of migrating cells after 24 hours of stimulation with SAA was 558±11 cells in the absence of NAC versus 270±15 cells in the presence of NAC. Similarly, the number of migrating cells after 24 hours of stimulation with S100B was 321±10 cells in the absence of NAC versus 94±8 cells in the presence of NAC.

These results suggest that, like S100B, SAA triggers RAGE-dependent oxidative signaling, leading to the migration of VSMCs.

SAA Controls Human VSMC Migration Through RAGE-Mediated Oxidative Stress

We assessed the relevance of our results to human disease, using human VSMCs. The stimulation of human VSMCs with SAA induced the production of significant amounts of ROS (36.5±7.7 versus 7.34±1.93 AU in control stimulated human VSMCs; P<0.0001). By contrast, the coincubation of cells with SAA and NAC significantly inhibited ROS production (17.2±4.16 AU P<0.0001 versus SAA alone; Figure 7A). Interestingly, a similar effect was observed in migration tests: SAA alone significantly induced human VSMC migration

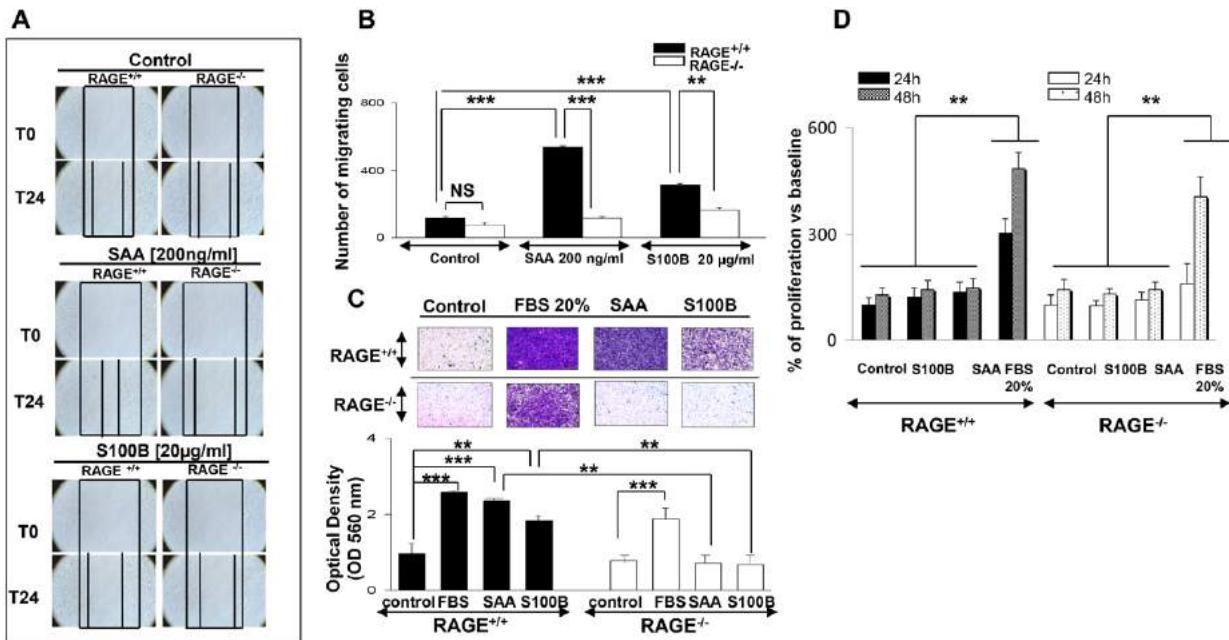


Figure 5. Serum amyloid A (SAA) induces the receptor for advanced glycation end products (RAGE)-dependent migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs). **A**, RAGE^{+/+} and RAGE^{-/-} VSMCs were seeded onto 6-well plates. At confluence, the cells were incubated with DMEM without FBS for 24 h (starvation). The monolayer was scratched with a sterile pipette tip and cells were exposed to the RAGE-specific ligand S100B (20 µg/mL) or to SAA (200 ng/mL) for 24 h. Images are representative of a wound area after 24 h of treatment. **B**, The number of migrated cells through the wound is expressed as the mean±SEM; n=7 independent experiments. **C**, Chemotactic migration assay. RAGE^{+/+} and RAGE^{-/-} VSMCs were incubated with S100B (20 µg/mL), SAA (200 ng/mL), or 20% FBS for 8 h at 37°C. The migrating cells were then stained and the optical density of the staining reagent was measured at 560 nm using a microplate reader. Results are expressed as the mean±SEM; n=3 independent experiments. **D**, Proliferation assay: RAGE^{+/+} and RAGE^{-/-} VSMCs were seeded with S100B (20 µg/mL), SAA (200 ng/mL), or FBS (20%, as positive control) for 24 and 48 h at 37°C. Cell proliferation was then determined by measuring the absorbance emitted by the reduction of WST-1 (cell proliferating reagent WST-1) soluble formazan. Results are expressed as the percentage of proliferating cells compared to the control. **P<0.01; ***P<0.001.

after 24 hours of stimulation (142±45 migrating cells versus 58±23 migrating cells in the control; $P<0.01$), whereas NAC significantly decreased cell migration (55±35 migrating cells; $P<0.01$ versus SAA-stimulated cells; Figure 7B). These results suggest that, like murine VSMCs, human VSMCs can migrate in response to SAA-induced ROS production. We then analyzed the signaling pathways involved and found that, by contrast to our findings for murine VSMCs, human VSMCs predominantly displayed MAPK-ERK phosphorylation in response to SAA and S100B, with no significant induction of AKT (Figure 7C). Incubation with NAC significantly inhibited the phosphorylation of MAPK-ERK induced by SAA and S100B. Finally, we analyzed RAGE and SAA expressions in human atherosclerotic lesions. Sections from aneurysmal resections of 6 patients were stained with control isotype antibodies or with antibodies against RAGE or SAA. Staining intensity was scored blindly (0–4 AU). The mean score was 0 AU for the isotype control, 2.5±1.38 AU for SAA, and 1.16±0.75 AU for RAGE. These results suggest that human atherosclerotic tissue expresses both RAGE and SAA, highlighting the potential role of this signaling pathway in human disease.

Discussion

The risk of cardiovascular events increases steadily with declining glomerular filtration rate.^{2,35–37} Overall, the uremic population has a 10× to 20× higher risk of death caused by

cardiovascular complications than the general population. This risk is even higher for younger patients on dialysis (<45 years old), who are 100× more likely to die from a cardiovascular event than age-matched individuals from the general population. Vascular disease in these patients involves arteriosclerotic lesions affecting the medial part of vessels and extensive atherosclerosis.³⁷ The frequency of traditional cardiovascular risk factors does not fully explain this high mortality rate. Other factors, including some related to uremia, must therefore contribute.

SAA is a highly conserved positive acute-phase protein. It is rapidly produced by the liver in response to tissue injury and cytokine release, resulting in a transient but significant increase in its concentration in serum, rising from 1 to 5 µg/mL to 1000 µg/mL in <24 h. About 95% of circulating SAA is reportedly bound to high-density lipoprotein (HDL). SAA production is thought to be a systemic response to tissue injury, which favors the recycling and reuse of body cholesterol, a critical constituent necessary for the generation of the enormous numbers of cells involved in the inflammatory response.⁶ However, a pathological role for SAA has been reported in systemic amyloidosis.¹⁶ SAA (isoform 1) binds to the ubiquitous cell surface protein RAGE,^{12,16} stimulating proinflammatory signaling, with the activation of nuclear factor-κB and cellular stress pathways. *Ager* deletion in a mouse model of SAA-related amyloidosis prevents amyloid deposition in the spleen and nuclear factor-κB activation.¹⁶

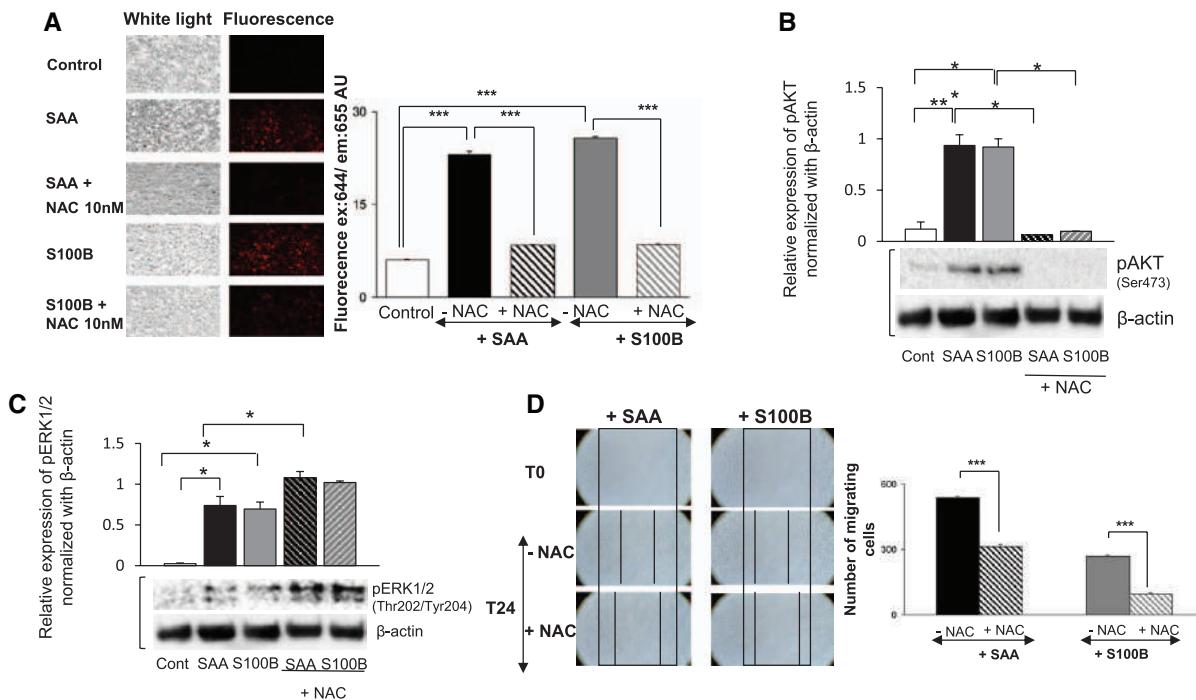


Figure 6. Serum amyloid A (SAA) promotes cell migration through the production of reactive oxygen species. **A**, Reactive oxygen species (ROS) generation was measured using the CellROX Red Deep Reagent fluorescent probe. RAGE^{+/+} vascular smooth muscle cells (VSMCs) were treated with S100B (20 µg/mL) or SAA (200 ng/mL) with or without the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) at 10 nmol/L for 30 min in the presence of the fluorescent dye. Results are expressed as the mean±SEM; n=3 independent experiments ***P<0.001. **B** and **C**, pAKT (S473), pERK1/2 (Thr202/Tyr204), and β-actin were quantified by western blotting in RAGE^{+/+} VSMCs treated for 4 h with S100B (20 µg/mL) or SAA (200 ng/mL) in the presence or absence of NAC (10 nmol/L). n=3 independent experiments. **D**, Representative images of scratch assay done with RAGE^{+/+} VSMCs treated for 24 h with S100B (20 µg/mL) or SAA (200 ng/mL) in the presence or absence of NAC (10 nmol/L). The number of migrating cells through the wound is expressed as the mean±SEM; n=3 independent experiments. **P<0.01; ***P<0.001.

We describe here a new pathological role for SAA. We found that the induction of uremia in mice promoted the formation of atherosclerotic lesions and stimulated the expression of RAGE and SAA. Mice deleted for RAGE were protected against uremia-induced accelerated atherosclerosis. Furthermore, in primary VSMCs, SAA triggered RAGE-dependent intracellular signaling, the production of ROS, and cell migration.

We used a well-characterized model of uremic vasculopathy. Indeed, several studies have shown that the induction of uremia in *Apoε*^{-/-} mice is associated with the appearance of vascular changes, such as atherosclerosis and vascular calcifications.^{32,33} These vascular modifications mimic those of uremic vasculopathy in humans. Our results are not only consistent with these previous reports but also identify SAA and RAGE as potential factors controlling uremia-related vascular modifications.

SAA has been detected in atherosclerotic lesions.^{6,10} However, the effect of the circulating lipid-free form of SAA on the development of atherosclerotic lesions was unclear. Lipid binding was thought to be necessary for the biological effect of SAA,⁶ but we report here that free SAA may also play an active role in atherosclerosis by modulating the functions of VSMCs in a RAGE-dependent manner. Our results are consistent with those of Dong et al,³⁸ who reported that the overexpression of free SAA in *Apoε*^{-/-} animals promoted

the development of atherosclerotic lesions in the absence of changes in cholesterol levels. Furthermore, Wilson et al⁸ reported that the stimulation of VSMCs with SAA in vitro promoted biglycan synthesis and, consequently, low-density lipoprotein fixation, potentially initiating atherosclerosis. Therefore, both HDL-bound SAA and lipid-free circulating SAA may have pathogenic effects in atherosclerosis.

The receptors potentially involved in the proatherosclerotic effects of SAA have not been extensively studied. A study by Cai et al¹² on freshly isolated peripheral blood monocytes suggested that free circulating SAA interacted with RAGE, leading to the activation of the MAPK kinase ERK and nuclear factor-κB and the secretion of monocyte tissue factor by these cells. Thus, the SAA-RAGE interaction may be critical for inflammation and thrombosis. Similarly, our results suggest that this interaction may be involved in uremia-related atherosclerosis. We cannot determine, with the mouse model used in our study, which cell type is targeted by the SAA-RAGE axis. However, our in vitro results strongly suggest that smooth muscle cells are important in the atherosclerotic process and are modulated by SAA in a RAGE-dependent manner.

In line with our results, we could speculate that the inhibition or invalidation of SAA could slow down the atherosclerotic process. Interestingly, De Beer et al³⁹ reported that SAA invalidation in *Apoε*^{-/-} mice was not associated with a reduction of atherosclerosis. The authors acknowledged that these

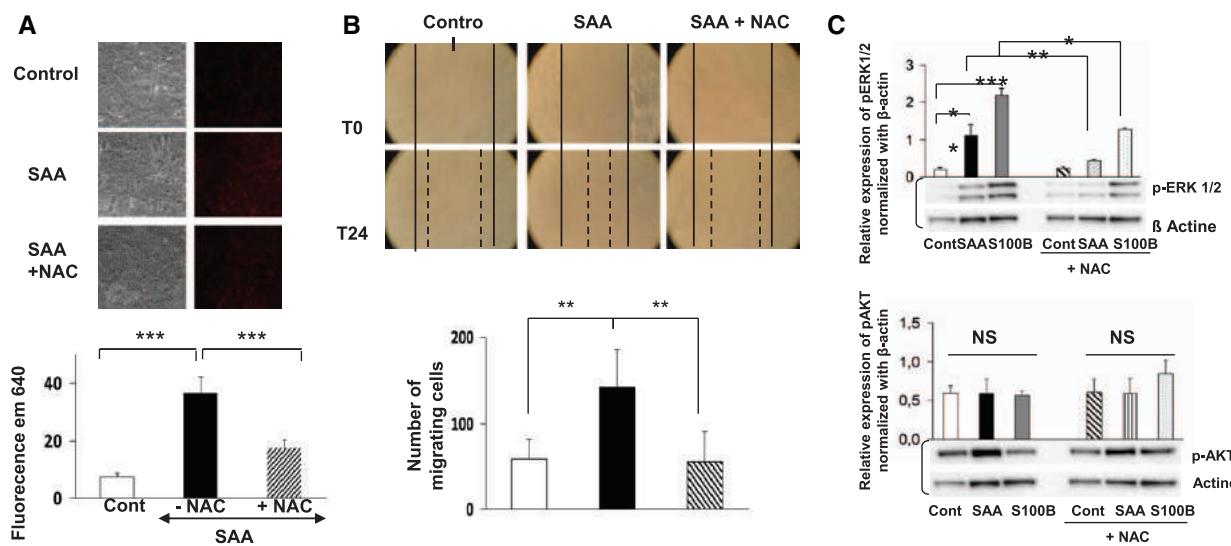


Figure 7. Serum amyloid A (SAA) promotes human cell migration through the production of reactive oxygen species. **A**, reactive oxygen species generation was measured using the CellROX Red Deep Reagent fluorescent probe. Human vascular smooth muscle cells (VSMCs) were treated with SAA (200 ng/mL) with or without the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) at 10 nmol/L for 30 min in the presence of the fluorescent dye. Results are expressed as the mean \pm SEM; n=3 independent experiments ***P<0.001. **B**, Representative images of scratch assay done human VSMCs treated for 24 h with SAA (200 ng/mL) in the presence or absence of NAC (10 nmol/L). The number of migrating cells through the wound is expressed as the mean \pm SEM; n=3 independent experiments. **P<0.01; ***P<0.001. **C**, pAKT (S473), pERK1/2 (Thr202/Tyr204), and β-actin were quantified by Western blotting in human VSMCs treated for 4 h with S100B (20 μg/mL) or SAA (200 ng/mL) in the presence or absence of NAC (10 nmol/L). n=3 independent experiments.

negative results did not imply that SAA was not involved in atherosclerotic process, but merely that SAA deletion was not sufficient to stop the atherosclerotic process. These findings should be analyzed in terms of the effect of RAGE invalidation in the same genetic background. Indeed, Harja et al²⁶ reported that ApoE^{-/-} mice produced larger amounts of RAGE ligands, such as S100 proteins and AGEs, and also increased expression of RAGE. The invalidation of RAGE in this animal model was associated with a significant reduction of atherosclerotic lesion surface area.²⁶ These observations, therefore, suggest that SAA invalidation alone may not be sufficient to inhibit RAGE signaling, and that a more profound protective effect is obtained when the multiligand receptor RAGE is invalidated than through the isolated invalidation of individual ligands.

RAGE signaling has been implicated in atherosclerosis and in vascular complications, but its involvement in uremia-related vascular changes has not been widely investigated.²⁷ However, RAGE ligands do accumulate in the context of uremia and are correlated with cardiovascular mortality.^{31,40,41} Moreover, Bro et al²⁷ reported that the administration of anti-RAGE antibodies limited uremia-induced atherosclerosis in mice. RAGE promotes the migration of various cell types.^{18,25} Here, we found that the SAA-RAGE interaction was important for the migration of VSMCs in vitro. Furthermore, we previously showed that the oxidative stress was a key mechanism by which RAGE mediated its effects.^{25,34} This study supports the view that RAGE-mediated oxidative stress is important for the regulation of VSMC migration, thereby highlighting the link between RAGE and oxidative stress. Our results suggest a possible role for the SAA-RAGE interaction in the pathophysiology of uremic atherosclerosis. Our data appear to be relevant to human atherosclerosis. Additional studies should,

therefore, be performed to highlight the role of the interaction between SAA and RAGE interaction for future therapeutic approaches.

We also found that serum SAA levels were higher in the first few weeks of uremia than at later time points, suggesting that the proatherogenic effect of SAA may occur during early phases of the atherosclerotic process. This is consistent with the results of Krishack et al⁴² for *ldlr*^{-/-} mice. They found that SAA invalidation in this genetic background was associated with a reduction of atherosclerosis after 6 weeks of a high-fat diet, with no further difference after 12 weeks. This suggests that SAA may be involved in the early phases of atherosclerosis.

Uremia is characterized by the retention of various solutes that would normally be excreted by the kidneys.^{29,43} Those able to interfere with biological functions are called uremic toxins. About 80 substances have been identified as toxins, including advanced glycation end products, such as carboxymethyl lysine and pentosidine, which interact with their specific receptor, RAGE.⁴⁴ In this study, we focused on the proatherogenic effect of SAA via interaction with RAGE, but the triggering of this receptor by other uremia-related ligands cannot be excluded.

Interestingly, chronic moderately high plasma SAA levels have been reported in uremic patients.⁷ Furthermore, proteomic analyses of the HDL cholesterol retrieved from these patients have revealed that higher levels of SAA are bound to HDL cholesterol in these patients than in healthy individuals.⁴⁵ The same authors also showed that the HDL isolated from uremic patients reduced cholesterol efflux from macrophages and reduced the expression of anti-inflammatory molecules by these cells.⁴⁵ These results suggest that, in uremic conditions, SAA binding to HDL cholesterol may regulate cholesterol

efflux and atherogenesis. Our findings suggest that SAA has a proatherogenic role during uremia. SAA accumulated in the plasma of uremic mice and exogenous lipid-free SAA modulated the functions of VSMCs in a RAGE-dependent manner *in vitro* in this study. Additional studies will be required to determine the pathological concentrations of SAA in the sera of uremic patients, the potential link to cardiovascular mortality and to confirm the biological effects of SAA mediated by interaction with RAGE. Nonetheless, this study identifies SAA as a potential new uremic toxin involved in uremic atherosclerosis and RAGE as an important actor in the development of uremic vasculopathy.

Acknowledgments

We thank Caroline Fichel (Division of Anatomopathology, Reims) for technical assistance. We also thank Leslie Migeon for help in the preparation of the article and Dr Christine Teryn (Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire). The authors thank Dr Guenter Fritz for his important contribution to this study in providing recombinant LPS-free S100B.

Sources of Funding

This work was supported by grants from "Fondation Lefoulon Delalande" (to K. Belmokhtar) and Société Francophone de Dialyse (to F. Touré).

Disclosures

None.

References

- Ortiz A, Covic A, Fliser D, Fouque D, Goldsmith D, Kanbay M, Mallamaci F, Massy ZA, Rossignol P, Vanholder R, Wiecek A, Zoccali C, London GM; Board of the EURECA-m Working Group of ERA-EDTA. Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *Lancet*. 2014;383:1831–1843. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60384-6.
- Driüeke TB, Massy ZA. Atherosclerosis in CKD: differences from the general population. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:723–735. doi: 10.1038/nrneph.2010.143.
- Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res*. 2015;116:1312–1323. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305012.
- Shroff R, Long DA, Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24:179–189. doi: 10.1681/ASN.2011121191.
- Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in CKD—evidence for premature ageing? *Nat Rev Nephrol*. 2013;9:661–670. doi: 10.1038/nrneph.2013.176.
- King VL, Thompson J, Tannock LR. Serum amyloid A in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22:302–307. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283488c39.
- Simic-Ogrizovic S, Dopsaj V, Bogavac-Stanojevic N, Obradovic I, Stosovic M, Radovic M. Serum amyloid-A rather than C-reactive protein is a better predictor of mortality in hemodialysis patients. *Tohoku J Exp Med*. 2009;219:121–127.
- Wilson PG, Thompson JC, Webb NR, de Beer FC, King VL, Tannock LR. Serum amyloid A, but not C-reactive protein, stimulates vascular proteoglycan synthesis in a pro-atherogenic manner. *Am J Pathol*. 2008;173:1902–1910. doi: 10.2353/ajpath.2008.080201.
- Lakota K, Mrak-Poljsak K, Bozic B, Tomsic M, Sodin-Semrl S. Serum amyloid A activation of human coronary artery endothelial cells exhibits a neutrophil promoting molecular profile. *Microvasc Res*. 2013;90:55–63. doi: 10.1016/j.mvr.2013.07.011.
- Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:3186–3190.
- Bang CA, Bro S, Bartels ED, Pedersen TX, Nielsen LB. Effect of uremia on HDL composition, vascular inflammation, and atherosclerosis in wild-type mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;293:F1325–F1331. doi: 10.1152/ajprenal.00039.2007.
- Cai H, Song C, Endoh I, Goyette J, Jessup W, Freedman SB, McNeil HP, Geczy CL. Serum amyloid A induces monocyte tissue factor. *J Immunol*. 2007;178:1852–1860.
- Holzer M, Birner-Gruenberger R, Stojakovic T, El-Gamal D, Binder V, Wadsack C, Heinemann A, Marsche G. Uremia alters HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:1631–1641. doi: 10.1681/ASN.2010111144.
- Sandri S, Rodriguez D, Gomes E, Monteiro HP, Russo M, Campa A. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *J Leukoc Biol*. 2008;83:1174–1180. doi: 10.1189/jlb.0407203.
- Cheng N, He R, Tian J, Ye PP, Ye RD. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J Immunol*. 2008;181:22–26.
- Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D, Kindy M. Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nat Med*. 2000;6:643–651. doi: 10.1038/76216.
- Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, Belov D, Rong LL, Sousa M, Andrassy M, Marso SP, Duda S, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth PP, Stern DM, Schmidt AM, Naka Y. Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J Clin Invest*. 2003;111:959–972. doi: 10.1172/JCI17115.
- Rong LL, Yan SF, Wendt T, et al. RAGE modulates peripheral nerve regeneration via recruitment of both inflammatory and axonal outgrowth pathways. *FASEB J*. 2004;18:1818–1825. doi: 10.1096/fj.04-1900com.
- Koch M, Chitayat S, Dattilo BM, Schieffner A, Diez J, Chazin WJ, Fritz G. Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Structure*. 2010;18:1342–1352. doi: 10.1016/j.str.2010.05.017.
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001;108:949–955. doi: 10.1172/JCI14002.
- Goury A, Meghraoui-Khedar A, Belmokhtar K, Vuillet V, Ortillon J, Jaïsson S, Devy J, Le Naour R, Tabary T, Cohen JH, Schmidt AM, Rieu P, Touré F. Deletion of receptor for advanced glycation end products exacerbates lymphoproliferative syndrome and lupus nephritis in B6-MRL Fas lpr/lpr mice. *J Immunol*. 2015;194:3612–3622. doi: 10.4049/jimmunol.1402342.
- Rai V, Touré F, Chitayat S, Pei R, Song F, Li Q, Zhang J, Rosario R, Ramasamy R, Chazin WJ, Schmidt AM. Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling. *J Exp Med*. 2012;209:2339–2350. doi: 10.1084/jem.20120873.
- Xue J, Ray R, Singer D, Böhme D, Burz DS, Rai V, Hoffmann R, Shekhtman A. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) specifically recognizes methylglyoxal-derived AGEs. *Biochemistry*. 2014;53:3327–3335. doi: 10.1021/bi500046t.
- Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D. RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes*. 1996;45(suppl 3):S77–S80.
- Touré F, Fritz G, Li Q, Rai V, Daffu G, Zou YS, Rosario R, Ramasamy R, Alberts AS, Yan SF, Schmidt AM. Formin mDia1 mediates vascular remodeling via integration of oxidative and signal transduction pathways. *Circ Res*. 2012;110:1279–1293. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.262519.
- Harja E, Bu DX, Hudson BI, et al. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE-/- mice. *J Clin Invest*. 2008;118:183–194. doi: 10.1172/JCI32703.
- Bro S, Flyvbjerg A, Binder CJ, Bang CA, Denner L, Olgaard K, Nielsen LB. A neutralizing antibody against receptor for advanced glycation end products (RAGE) reduces atherosclerosis in uremic mice. *Atherosclerosis*. 2008;201:274–280. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.01.015.
- Basta G, Leonards D, Mallamaci F, Cutrupi S, Pizzini P, Gaetano L, Tripepi G, De Caterina R, Zoccali C. Circulating soluble receptor of advanced glycation end product inversely correlates with atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2010;77:225–231. doi: 10.1038/ki.2009.419.
- Vanholder R, Baumeister U, Brunet P, Cohen G, Glorieux G, Jankowski J; European Uremic Toxin Work Group. A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:863–870. doi: 10.1681/ASN.2007121377.
- Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res*. 2010;106:842–853. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.212217.
- Isoyama N, Leurs P, Qureshi AR, Bruchfeld A, Anderstam B, Heimburger O, Bárány P, Stenvinkel P, Lindholm B. Plasma S100A12 and soluble receptor of advanced glycation end product levels and mortality in chronic

- kidney disease Stage 5 patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30:84–91. doi: 10.1093/ndt/gfu259.
- 32. Massy ZA, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, Angulo J, Szumilak D, Mothu N, Phan O, Daudon M, Lacour B, Drueke TB, Muntzel MS. Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:109–116. doi: 10.1681/ASN.2004060495.
 - 33. Bro S, Borup R, Andersen CB, Moeller F, Olgaard K, Nielsen LB. Uremia-specific effects in the arterial media during development of uremic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:570–575. doi: 10.1161/01.ATV.0000201060.47945.cb.
 - 34. Daffu G, del Pozo CH, O’Shea KM, Ananthkrishnan R, Ramasamy R, Schmidt AM. Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond. *Int J Mol Sci*. 2013;14:19891–19910. doi: 10.3390/ijms141019891.
 - 35. Fort J. Chronic renal failure: a cardiovascular risk factor. *Kidney Int Suppl*. 2005;S25–S29.
 - 36. London GM, Drueke TB. Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int*. 1997;51:1678–1695.
 - 37. London GM, Marchais SJ, Guérin AP, Métivier F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14:525–531.
 - 38. Dong Z, Wu T, Qin W, An C, Wang Z, Zhang M, Zhang Y, Zhang C, An F. Serum amyloid A directly accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Med*. 2011;17:1357–1364. doi: 10.2119/molmed.2011.00186.
 - 39. De Beer MC, Wroblewski JM, Noffsinger VP, Rateri DL, Howatt DA, Balakrishnan A, Ji A, Shridas P, Thompson JC, van der Westhuyzen DR, Tannock LR, Daugherty A, Webb NR, De Beer FC. Deficiency of endogenous acute phase serum amyloid A does not affect atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:255–261. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302247.
 - 40. Shiotsu Y, Mori Y, Nishimura M, Sakoda C, Tokoro T, Hatta T, Maki N, Iida K, Iwamoto N, Ono T, Matsuoaka E, Kishimoto N, Tamagaki K, Matsubara H, Kosaki A. Plasma S100A12 level is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:718–723. doi: 10.2215/CJN.08310910.
 - 41. Wagner Z, Molnár M, Molnár GA, Tamaskó M, Laczy B, Wagner L, Csiky B, Heidland A, Nagy J, Wittmann I. Serum carboxymethyllysine predicts mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2006;47:294–300. doi: 10.1053/j.ajkd.2005.10.010.
 - 42. Krishack PA, Bhanvadia CV, Lukens J, Sontag TJ, De Beer MC, Getz GS, Reardon CA. Serum amyloid A facilitates early lesion development in Ldlr^{-/-} Mice. *J Am Heart Assoc*. 2015;4. doi: 10.1161/JAHHA.115.001858.
 - 43. Eloot S, Schepers E, Barreto DV, Barreto FC, Liabeuf S, Van Biesen W, Verbeke F, Glorieux G, Choukroun G, Massy Z, Vanholder R. Estimated glomerular filtration rate is a poor predictor of concentration for a broad range of uremic toxins. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:1266–1273. doi: 10.2215/CJN.09981110.
 - 44. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, Argiles A; European Uremic Toxin Work Group. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:1258–1270. doi: 10.1681/ASN.2011121175.
 - 45. Weichhart T, Kopecky C, Kubicek M, Haidinger M, Döller D, Katholnig K, Suarna C, Eller P, Tölle M, Gerner C, Zlabinger GJ, van der Giet M, Hörl WH, Stocker R, Säemann MD. Serum amyloid A in uremic HDL promotes inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:934–947. doi: 10.1681/ASN.2011070668.

Significance

Extensive atherosclerosis is a pathogenic feature of uremic vasculopathy. We report that the induction of uremia in mice increases atherosclerotic lesion surface and upregulates the expression of serum amyloid A and receptor for advanced glycation end products (RAGE) in the vasculature. Mice deleted for RAGE are protected against uremia-induced acceleration of atherosclerosis. In addition, serum amyloid A modulates the functions of murine and human vascular smooth muscle cells in a RAGE-dependent manner, suggesting that serum amyloid A–RAGE signaling may be involved in the development of uremic atherosclerosis. These data indicate that serum amyloid A may be considered a uremic toxin and RAGE as an important actor in uremic vasculopathy.

**SIGNALING OF SERUM AMYLOID A THROUGH RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION
END PRODUCTS MEDIATES UREMIA-RELATED ATHEROSCLEROSIS**

Karim Belmokhtar,¹, Thomas Robert^{1,2}, Jeremy Ortillon¹, Antoine Braconnier² Vincent Vuiblet^{1,2}
Camille Boulagnon-Rombi³, Marie Danièle Diebold^{1,3}, Christine Pietrement^{1,4}, Anne Marie
Schmidt⁵, Philippe Rieu^{1,2} and Fatouma Touré^{1,2}

METHODS

Animals and induction of uremia

Apoe^{-/-} male mice in the C57BL/6 background were purchased from Charles River Laboratories®. *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} mice were generated using a backcross-intercross scheme in the animal facility of New York University (Dr Schmidt)¹. Then embryos from the F3 generation were rederived and mice issued from the rederivation process transferred to the animal facility of Reims France (URCANIM). Animals were housed in a barrier- and pathogen-free animal facility with a 12 h light-dark cycle and were fed a regular chow diet. All experiments were approved by the ethics committee for animal care and use of Reims Champagne Ardenne (CEEA-RCA-56). The number of mice per experiment is indicated in figure legends.

Apoe^{-/-} or *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} 8-week old male mice were randomly assigned to CKD or sham-operated groups (Sham). A two-step surgical procedure was used to induce CKD². Surgery was performed under xylazine (Rompun 2%; Bayer, Leverkusen, Germany) (6 µg/g of body weight) and ketamine (Clorketam 1000; Vetoquinol SA, Lure, France) (120 µg/g of body weight) anesthesia. The two poles of the left kidney were excised, and one week later the right kidney was removed, resulting in a 75% reduction in total renal mass. Control animals underwent sham operations involving the decapsulation of both kidneys. Two weeks after surgery, blood was collected and urea levels were assessed in the two groups. Urea levels were significantly higher in uremic animals than in sham-operated mice (Table1). All mice

were sacrificed under anesthesia (ketamine and xylazine) 12 weeks after surgery and the arterial tree was perfused *in situ* with PBS (under a pressure of 100 mm Hg) for 10 min via a cannula in the left ventricular apex. The heart plus aortic root was excised and stored in OCT at -80°C. Aortas were dissected and aortic arches were fixed for 24 h in formalin, whereas the thoracic and abdominal aortas were incubated in RNAlater (Qiagen, Austin TX, USA).

Histological Analysis

For the aortic roots sections, the ventricular edge and approximately 1 mm of the aortic root were immediately dissected under the microscope and cryomounted in optimal cutting temperature embedding medium. Cryosections, cut in 7 μ m-thick slices, were collected and numbered from the appearance of the first cusps (point 0); sections at 200- μ m, 400- μ m, 600- μ m and 800- μ m distances from the cusps were stained with red oil O and mounted under coverslip³. The atherosclerotic lesion was quantified using ImageJ® software. Briefly, for each mouse, the total surface area of heart valve and surface occupied by the atherosclerotic lesion were measured separately. Results are presented as the ratio between the area of the lesion and the total area.

Aortic arches were analyzed by immunohistochemistry with the indirect immuno-peroxidase staining technique on paraffin-embedded sections with hematoxylin counterstain and a Ventana Benchmark XT automatic analyzer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Paraffin sections (4- μ m) were used for SAA, RAGE and α SMA immunostaining. Briefly, sections were placed on poly-L-lysine-coated slides (SuperFrost II®), deparaffinized using the EZ-Prep kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) at 75°C for 4 min, subjected to antigen retrieval for 8 min at 95°C in Tris buffer cell conditioning solution® (pH 7.5) (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), and treated at 37°C for 4 min with UltraView Inhibitor® (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) to block endogenous peroxidase.

Sections were then incubated for 1 hour at 37°C with a rabbit polyclonal anti-SAA (anticorps-enligne®, Paris, France) at a 1:100 dilution in antibody diluent (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) or with a rabbit polyclonal anti-RAGE or with a rabbit polyclonal anti- α SMA (Abcam, Cambridge, UK) at a 1:50 dilution, or with corresponding control Isotype (IgG1, Dako-Agilent, Glosstrup, Denmark). Immunohistochemical staining was performed with an HRP kit (Universal HRP Multimer kit, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). The complex was then visualized with a hydrogen peroxide substrate and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) as the chromogen. Slides were rinsed with a Tris-based buffer solution, counter-stained with hematoxylin, post-counterstained with an aqueous solution of buffered lithium carbonate (Bluing Reagent, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) and mounted.

Measurement of serum SAA levels

Serum from sham operated (n=9) and uremic (n=11) mice was collected, aliquoted and stored at -80°C until further use. SAA levels were measured using a commercially available murine ELISA kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Isolation of vascular smooth muscle cells

Briefly, *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs were isolated from the aortas of male 10-week-old mice and were cultured according to an explant protocol consistent with institutional guidelines⁴. Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The aorta from the subclavian branch to the renal bifurcation was excised aseptically from the animal and placed into ice-cold PBS. After removal of the peri-aortic fat, the vessels were incubated at 37°C for 25 min in a cocktail of DMEM, antibiotics, 1% collagenase and 1% soybean trypsin inhibitor. The digested vessels were carefully cut into small pieces and plated

in 6-well plates for at least 7 days in DMEM with 10% FBS, antibiotics/antimycotics and 2 mM of glutamine to induce smooth muscle cell proliferation. Cultures were composed of more than 95% α -SMA positive cells according to immunostaining. Experiments were conducted on VSMCs between passage 4 and passage 10.

For some experiments human vascular smooth muscle cells (Promocell® Heidelberg, Germany) were used.

Migration of Vascular Smooth muscle cells

VSMC migration in response to recombinant endotoxin-free SAA (R&D, Minneapolis, MN, USA) or a RAGE ligand, endotoxin-free S100B, (gift from Dr Guenter Fritz, Frieburg, Germany) was assessed with the QCM Colorimetric Cell Migration Assay (Chemicon, Billerica, USA). VSMCs (5×10^5) were seeded in the upper chamber with 200 μ l of RPMI 1640 medium supplemented with 0.5% FBS. A total of 600 μ l of medium without FBS (control) or containing 20% FBS (positive control), SAA (200 ng/ml) or S100B (20 μ g/ml) was added to the lower chamber in the same culture medium. After incubation at 37°C for 8h, the inserts were fixed with 4% paraformaldehyde, and the cells were stained with Giemsa solution. Cells that had migrated through the porous membrane were incubated with Cell Stain Solution (Chemicon, Billerica, USA) followed by extraction and measurement of optical density at 560 nm.

Migration was also assessed with a wounding assay. Cells were grown to confluence in 6-well plates, then starved from serum for 12h. Then a scratch was made in the plate with a P200 pipette tip. Pictures were immediately taken to assess the baseline width of each scratch (T0). Effectors or inhibitors were then added and cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ to allow migration. Wound width was measured from pictures taken at 0 and 24 h, after wounding and the number of cells migrating below the T0 wound were quantified as effective migrating cells.

Detection of Reactive Oxygen Species

Ager^{+/+} or *Ager^{-/-}* VSMCs were seeded onto chamber slides (Nunc, Roskilde, Denmark), for 24h in complete medium then starved from serum for 12h. Cells were then incubated in the presence or absence of SAA (200 ng/ml) or S100B (20 µg/ml) with or without antioxidant N-acetylcysteine (10nM) for 30 minutes. Then, cells were stained with 5 µmol/L CellROX Deep Red reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) in serum free medium for 30 minutes at 37°C, followed by three washes with PBS. Fluorescence was visualized in living cells using a temperature and CO₂-controlled inverted microscope (Zeiss). Reactive oxygen species (ROS) were detected (excitation wavelength: 644 nm and emission wavelength: 665 nm) and were quantified with ImageJ® software. The fluorescent intensity of each cell was measured and mean fluorescent intensity of each condition (i.e. the sum of the fluorescence of each cell divided by the number of cells counted) is shown in the corresponding image.

Cell proliferation assay

VSMCs were seeded at 8x10³ cells per well in 96-well plates, in DMEM supplemented with 10% FBS and allowed to adhere for 12 h. The media was removed and replaced with DMEM basal media overnight (serum starvation). Then, 100 µl of medium without FBS (control) or containing 20% FBS (positive control), SAA (200 ng/ml) or S100B (20 µg/ml) was added. At 24 and 48 h, the number of cells was quantified by nonradioactive colorimetric assay WST-1 (RocheTM Molecular Biochemical, Mannheim Germany), according to the manufacturer's instructions.

RNA extraction and RT-PCR

Aortas were removed from RNAlater (Qiagen, Austin, Tx, USA) and tissue samples were ground to a fine powder in liquid nitrogen and incubated in lysis buffer (Qiagen, Austin, Tx, USA). Total RNA was then extracted from cells using the RNAeasy Mini kit Plus® (Qiagen, Austin, Tx, USA) according to the manufacturer's instructions.

The same protocol was used to extract RNA from *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs treated with SAA or S100B for different times. First-strand cDNA was synthesized using the first strand synthesis kit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). The relative amounts of RAGE, mRNA were determined by quantitative real-time PCR. EF1a was used as a reference gene. The primer sequences used in our study were as follows: RAGE: 5'ggacccttagctggcacttagat3' and 5'gagtcccgctcagggtgtct3', EF1a: 5'ctggagccaagtgctaataatgcc3' and 5'ccaggcttgagaacaccagtc3' (Eurofins, Ebersberg, Germany).

Western blotting

Aortas were retrieved from uremic and sham operated animals and conserved at -80°C until use. *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs were stimulated with SAA (200 ng/ml) or S100B (20 µg/ml) with or without antioxidant N-acetylcysteine (10nM) for 0, 5, 15 or 30 min or 4 hours. Then, harvested cells or aortas were lysed in ice-cold lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA) with protease inhibitors. Particulate material was removed by centrifugation, and protein concentration was determined by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Equal amounts of total protein (10–30 µg/sample) were subjected to SDS-PAGE (7.5–12%) followed by electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes. Nonspecific binding was blocked by the incubation of membranes with nonfat dry milk (5%) for 1 hour. Then, membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies: anti-phospho-AKT (ser 473), anti-phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) and anti-β-actin (BD Biosciences, San Jose, USA). Primary antibodies were detected with HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (1:5,000, GE Healthcare).

Statistical analysis

In all experiments, unless otherwise indicated, data are reported as the mean ± SEM of at least three replicates per group. Data were analyzed by post hoc comparisons using a 2-tailed t test,

and a p value ≤ 0.05 was considered significant. Statistical comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA).

REFERENCES

1. Harja E, Bu DX, Hudson Bl, Chang JS, Shen X, Hallam K, Kalea AZ, Lu Y, Rosario RH, Oruganti S, Nikolla Z, Belov D, Lalla E, Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE-/- mice. *J Clin Invest.* 2008;118:183-194.
2. Pietrement C, Gorisse L, Jaisson S, Gillery P. Chronic increase of urea leads to carbamylated proteins accumulation in tissues in a mouse model of CKD. *PLoS One.* 2014;8:e82506.
3. Massy ZA, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, Angulo J, Szumilak D, Mothu N, Phan O, Daudon M, Lacour B, Drueke TB, Muntzel MS. Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:109-116.
4. Toure F, Fritz G, Li Q, Rai V, Daffu G, Zou YS, Rosario R, Ramasamy R, Alberts AS, Yan SF, Schmidt AM. Formin mDia1 mediates vascular remodeling via integration of oxidative and signal transduction pathways. *Circ Res.* 2012;110:1279-1293.

Article 2 :

Receptor for advanced glycation end products (RAGE) : A key molecule in the genesis of CKD vascular calcification and a potential modulator of sodium phosphate co-transporter PiT-1 expression. (En révision)

Soumis à Kidney International

Belmokhtar K, Ortillon J*, Jaïsson S, Massy ZA, Boulagnon-Rombi C, Günter F
Gillery P, Schmidt AM, Rieu P, Toure F*

*** contribution égale**

Les calcifications vasculaires sont issues d'un remodelage de la paroi vasculaire et sont fréquemment retrouvées chez les patient atteints d'IRC. Le processus de calcification augmente la rigidité artérielle qui est un facteur de risque cardiovasculaire, expliquant l'incidence élevée de mortalité chez ces patients.

Au cours de l'IRC, plusieurs types de calcifications sont observés, au niveau des plaques d'athérome et au niveau de la média. La formation des calcifications artérielles répond à un processus finement régulé qui reproduit la formation osseuse, due à un changement phénotypique des cellules musculaires lisses (CMLv) en cellules ostéoblastiques formant une matrice osseuse.

La rétention de molécules qui ne sont plus épurées par les reins comme le phosphate ou les produits de la glycation avancée, entraîne une différenciation ostéoblastique des CMLv. En effet, plusieurs études ont montré que l'exposition d'AGEs, induit une ostéodifférenciation des CMLv, *via* l'interaction avec RAGE, caractérisée par un dépôt de calcium et la synthèse de collagène de type I [259], [261]–[263], [279].

Ainsi nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation sérique des ligands de RAGE associée à leurs interactions avec ce récepteur participent à la formation des calcifications cardiovasculaires au cours de l'IRC.

Pour répondre à cette hypothèse et dans le cadre de cette seconde publication (pages 105-145), nous avons dans la première partie de l'étude utilisé une approche *in vivo*, à l'aide d'un modèle murin de vasculopathie urémique dans le fond génétique C57/Bl6 ApoE^{-/-} et ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}. L'insuffisance rénale chronique a été induite par une néphrectomie au 5/6^{ème}, des animaux n'ayant pas subi de néphrectomies ont été utilisés comme contrôle. Après 12 semaines d'IRC, les animaux ont été sacrifiés, le sérum ainsi que les valves et crosses aortiques ont été prélevés afin d'étudier la cinétique d'accumulation de la Nε-carboxyméthyl-lysine (CML) et des protéines S100 au niveau sérique et tissulaire parallèlement à l'étude de l'apparition des dépôts de calcifications vasculaires.

A l'aide de cette approche nous avons observé que la concentration en CML et en

protéines S100 au niveau sérique était significativement augmentée chez les souris ApoE^{-/-} rendu urémique. De plus la concentration en CML ainsi que la transcription de RAGE au niveau de la paroi aortique sont également augmentés chez ces souris comparées aux non urémiques.

Parallèlement, à l'accumulation de ces deux ligands de RAGE, des études histologiques ont permis de montrer au niveau des valves aortiques, une augmentation significative des calcifications vasculaires au sein de celles-ci, chez des souris ApoE^{-/-} rendues urémiques comparé aux non urémiques. De plus, on observe également que la délétion de RAGE réduit cette augmentation induite par l'IRC. Le dosage du calcium au sein de l'aorte, à l'aide d'un kit commercial a permis de confirmer ces résultats.

Afin de savoir si les dépôts de calcium observés histologiquement ou par dosage, sont dus à un phénomène actif d'ostéodifférenciation au cours de l'IRC, nous avons étudié l'expression d'un des principaux facteurs de différenciation ostéoblastique, *Runx2*. Nous avons observé une augmentation significative de la transcription de *Runx2* au cours de l'IRC chez les souris ApoE^{-/-}, et que la délétion de RAGE chez ces souris urémiques, n'induisait pas d'augmentation de *Runx2*.

Ces résultats in vivo, ont montré après 12 semaines d'IRC une augmentation significative des calcifications vasculaires parallèlement à une augmentation d'expression de RAGE au niveau artériel, mais également une augmentation au niveau sérique de ces ligands (CML et S100). La délétion de RAGE protège donc de l'apparition des calcifications induites par l'urémie. Nous émettons l'hypothèse que l'interaction ligands de RAGE/RAGE induit l'ostéodifférenciation des CMLv.

Dans la suite de l'étude, nous nous sommes intéressés à la mécanistique de l'ostéodifférenciation des CMLv induites par l'interaction de RAGE et de ses ligands. Pour cela, nous avons utilisé des CMLv primaires isolées à partir d'aorte de souris C57/Bl6 délétées ou non pour RAGE.

- Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse que l'activation de RAGE était capable d'induire la formation de calcifications vasculaires.

Pour cela, nous avons stimulé des CMLv avec du S100A12 mais également avec

du phosphate inorganique (Pi) (contrôle positif pour l'induction des calcifications). Nous avons observé à l'aide de la coloration au rouge Alizarine, une augmentation significative de la formation de dépôts calcique au niveau des CMLv en présence de S100A12 et de Pi pendant 7 jours. De plus, la délétion de RAGE protégeait de cette formation induite par le S100A12 mais également en présence de Pi.

Les mêmes conditions expérimentales ont été réalisées afin d'étudier la présence de marqueurs ostéoblastiques. Nous avons observé que le S100A12 et le Pi induisait une augmentation significative de l'expression (ARNm et protéique) de *Runx2*, de collagène de type I et de *BMP-2* et que la délétion de RAGE réduisait l'expression de chacun de ces marqueurs en présence de ces deux inducteurs.

Ces résultats montrent que RAGE est impliqué dans la formation des calcifications vasculaires via une ostéodifférenciation des CMLv. Ils montrent également l'existence d'un lien entre la signalisation du Pi et la signalisation de RAGE.

- Dans un second temps, nous avons émis l'hypothèse que l'activation de RAGE était capable de réguler l'expression du co-transporteur de phosphate inorganique PiT-1. En effet, ce co-transporteur est impliqué au cours de l'ostéodifférenciation des CMLv.

Pour cela, nous avons étudié l'expression de PiT-1 (ARNm et protéique) au niveau des CMLv en présence ou non de ligand de RAGE (S100A12) ou de Pi. Nous avons observé que l'expression de PiT-1 était significativement augmentée en présence de S100A12 et de Pi, et que la délétion de RAGE protégeait de cette augmentation induite par ces deux ligands.

Ces résultats montrent que RAGE participe à l'ostéodifférenciation des CMLv via la régulation de l'expression du co-transporteur du phosphate inorganique PiT-1.

- Dans un troisième temps, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de PiT-1 via RAGE était dépendante des espèces réactives de l'oxygène. En effet, nous avons déjà montré que la signalisation de RAGE induisait

la production de ROS, mais il a également été décrit dans la littérature que les ROS induisaient l'expression de Runx2 conduisant à l'expression de PiT-1 [280]. Pour cela, nous avons observé à l'aide d'une sonde fluorogénique permettant de mesurer le stress oxydatif, une augmentation significative de la formation d'espèces réactives de l'oxygène au niveau des CMLv en présence de S100A12 et de Pi. La délétion de RAGE protégeait de cette productions d'espèces réactives de l'oxygène induite par ces ligands.

De plus, l'inhibition de la production des espèces réactives de l'oxygène induite par la N-acétyl cystéine, inhibait significativement l'expression de PiT-1 et de Runx2 en présence de S100A12 ou de Pi.

Ces résultats montrent que RAGE régule l'expression du co-transporteur du phosphate inorganique PiT-1 via la production des espèces réactives de l'oxygène.

Cette étude a permis de montrer que dans un modèle murin d'IRC, la délétion de RAGE est protectrice face à l'apparition de calcifications vasculaires. De plus, in vitro, des cultures primaires de CMLv stimulées par un ligand de RAGE développent des calcifications extracellulaires, après une transformation ostéoblastique, alors que les cellules RAGE/- sont protégeait de cette transformation. Nous avons également constaté que la délétion de RAGE protège les effets pro-calcifiants du phosphate inorganique (Pi). La recherche d'une voie de signalisation commune au Pi et aux ligands de RAGE nous a amené à étudier le co-transporteur du phosphate Pit-1. Nous avons pu montrer que la délétion de RAGE protégeait de l'augmentation : de l'expression de Pit-1 in vivo au cours de l'IRC, et in vitro induite par le Pi ou les ligands de RAGE via l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). En outre, l'augmentation des ROS favorise la production des ligands de RAGE.



**RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS
(RAGE):A KEY MOLECULE IN THE GENESIS OF CKD
VASCULAR CALCIFICATION AND A POTENTIAL MODULATOR
OF SODIUM/PHOSPHATE CO-TRANSPORTER PIT-1
EXPRESSION**

Journal:	<i>Kidney International</i>
Manuscript ID	KI-08-17-1215
Article Type:	Basic Research
Date Submitted by the Author:	08-Aug-2017
Complete List of Authors:	Belmokhtar, Karim; CNRS URCA UMR 7369, Ortillon, Jeremy; CNRS URCA UMR 7369, Jaïsson, Stéphane; University Hospital of Reims, Laboratory of Pediatric Biology and Research Massy, Ziad; Ambroise Paré Hospital, Division of Nephrology Boulagnon-Rombi, Camille; CHU Reims, Department of Pathology Fritz, Guenter; Institute of Neuropathologie - University of Freiburg Gillery, Philippe; Faculty of Medicine, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology CNRS UMR 6237; University Hospital of Reims, Laboratory of Pediatric Biology and Research Schmidt, Ann Marie; New York University Langone Medical Center, Diabetes Research Program Rieu, Philippe; Hopital Maison Blanche, Nephrology Touré, Fatouma; CHU Reims, Department of Nephrology; CNRS URCA UMR 7369,
Keywords:	vascular calcification, uremic toxins
Subject Area:	Cell Biology, Mineral and Bone Disorders

SCHOLARONE™
Manuscripts

RECEPTOR FOR ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS (RAGE) : A KEY MOLECULE IN THE GENESIS OF CKD VASCULAR CALCIFICATION AND A POTENTIAL MODULATOR OF SODIUM PHOSPHATE CO-TRANSPORTER PIT-1 EXPRESSION

Karim Belmokhtar^{¥,1,3}, Jeremy Ortillon^{¥,1,3}, Stéphane Jaisson^{1,6}, Ziad A. Massy^{7,8},

Camille Boulagnon Rombi^{1,4}, Günter Fritz⁹, Philippe Gillery^{1,6}, Ann Marie Schmidt⁵,

Philippe Rieu^{1,2,3} and Fatouma Touré^{1,2,3}

[¥]Both authors contributed equally

¹*Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 7369 (Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, MEDyC)*

²*CHU Reims, Division of Nephrology, 51100 Reims, France*

³*Laboratoire de Néphrologie, Faculté de Médecine, 51100, Reims, France*

⁴*CHU Reims, Division of Anatomopathology, 51100 Reims, France*

⁵*Diabetes Research Program, NYU, New York, New York, USA*

⁶*University Hospital of Reims, Maison Blanche Hospital, Laboratory of Pediatric Biology and Research, Reims, France*

⁷*Division of Nephrology, Ambroise Paré Hospital, APHP, Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines University (Paris-Ile-de-France-Ouest University), UVSQ), Boulogne Billancourt/Paris, France*

⁸*Inserm U1018, Team5, CESP, Paris Saclay University and Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines University (Paris-Ile-de-France-Ouest University, UVSQ), Villejuif, France*

⁹*Institute of Neuropathology, University of Freiburg*

Running Title: RAGE, Pit-1 and uremic vascular calcifications

Address correspondence to: Fatouma Touré, MD, PhD

Division of Nephrology & URCA CNRS UMR 7369

Hôpital Maison Blanche,

45 rue Cognacq-Jay

51100 Reims - France.

Fax: +33 3 26 78 37 76

Phone: +33 3 26 78 76 38

E-mail: ftoure@chu-reims.fr

ABSTRACT

Chronic Kidney Diseases (CKD) are associated with increased cardiovascular mortality and frequent cardiovascular calcification. CKD is also associated with the accumulation of uremic toxins. Some (advanced glycation end products and S100 proteins) interact with the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and lead to the activation of several pathways. In the present work, we aimed to investigate the possible role(s) of RAGE in the CKD vascular calcification process in a well-established apolipoprotein E knockout (*Apoe*^{-/-}) mouse CKD model. *Apoe*^{-/-} or *Apoe*^{-/-}*Ager* (RAGE)^{-/-} male mice, aged eight weeks, were randomly assigned to CKD or sham-operated groups. For mechanistic studies, primary cultures of *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} vascular smooth muscle cells (VSMCs) were established and stimulated with either vehicle, inorganic phosphate (Pi), or RAGE ligands (S100A12, 20μM). After 12 weeks of CKD, we observed a significant increase in RAGE ligand (AGE and S100 proteins) concentrations in the serum of CKD *Apoe*^{-/-} mice in comparison with sham-operated mice. *Ager* mRNA levels were four-fold higher in CKD vessels of *Apoe*^{-/-} mice than those of sham-operated mice. CKD *Apoe*^{-/-}, but not CKD *Apoe*^{-/-}*Ager*^{-/-} mice, displayed a marked increase in the vascular calcification surface area and in the mRNA levels of Runx2. *In vitro*, stimulation of *Ager*^{+/+} VSMCs with Pi or S100A12 induced extracellular matrix mineralization and osteoblast transformation. RAGE ligand- and Pi-induced VSMC calcification was inhibited respectively by phosphonoformic acid (a non-selective phosphate co-transporters inhibitor) and *Ager* deletion. *In vivo* and *in vitro*, RAGE was necessary for the regulation of the expression of the sodium phosphate cotransporter, Pit-1, at least in part through production of reactive oxygen species (ROS). Our results show that RAGE is one additional key molecule involved in the genesis of cardiovascular calcification in CKD mice. RAGE effects may be due, at least in part, to the modulation of the co-transporter Pit-1 expression.

INTRODUCTION

The risk of cardiovascular events increases steadily with a declining glomerular filtration rate. Individuals with Chronic Kidney Diseases (CKD) have a 10- to 20-fold higher risk of death due to cardiovascular complications than the general population^{1, 2-4}. Vascular disease in these patients consists of mixed lesions, including arteriosclerotic lesions (affecting the medial layer of vessels) and extensive atherosclerosis⁵⁻⁸. The principal feature of CKD-induced arteriosclerotic remodeling is vascular calcification. This calcification is significantly accelerated and intensified in End Stage Renal Disease (ESRD) patients⁹⁻¹². Once established, vascular calcification can lead to devastating organ failure. Indeed, cohort studies in dialyzed patients report a strong correlation between vascular calcification and cardiovascular morbidity-mortality^{9, 13, 14}.

Recent advances in our understanding of the pathophysiology of vascular calcification suggest that it results from an actively regulated process arising from several non-mutually exclusive mechanisms,^{12, 15} which can be classified into two groups: mineral and cellular processes. The process of mineralization involves a decrease in the concentrations of circulating mineralization inhibitors (Fetuin A, osteoprotegerin, matrix Gla protein) and/or increased concentrations of circulating nucleation complexes resulting from bone remodeling. Cellular mechanisms result from alterations of vascular smooth muscle cell (VSMC) function, including trans-differentiation into osteoblasts and programmed cell death (apoptosis)^{10, 16}.

The mechanisms underlying CKD vascular calcification are multifactorial but the triggering factors remain currently undefined. The definition of these factors is a critical barrier for the development of treatments targeting CKD vascular calcification.

Aside from increased vascular complications, CKD is also characterized by the retention of various solutes that are normally excreted by the kidneys¹⁷. Some correlate with

cardiovascular mortality and interact with specific receptors, such as the Receptor for Advanced Glycation end Products (RAGE) (¹⁸⁻²¹ a ubiquitous multi-ligand receptor of the immunoglobulin superfamily (^{22, 23}).

Therefore, CKD can be considered as a pathogenic condition associated with the accumulation of RAGE ligands, such as Advanced Glycation End products (AGEs), S100 proteins, and Serum Amyloid A (SAA), leading to increased activation of RAGE signaling. We and others have previously shown the central role of RAGE signaling in regulating VSMC function during general vascular remodeling processes ²⁴⁻²⁶. In addition, this pro-inflammatory receptor is involved in more specific CKD related vascular changes, such as the migration of VSMCs and uremic atherosclerosis ^{26, 27}.

Therefore, we aimed to investigate whether RAGE signaling is involved in the osteoblast transformation of VSMCs that lead to CKD vascular calcification using *in vivo* and *in vitro* approaches.

RESULTS

CKD promotes accumulation of RAGE ligands and increased expression of RAGE *in vivo*

We used a previously described well-established CKD mouse model to study the role of RAGE signaling in vascular calcification ^{28, 29}. We subjected *Apoe*^{-/-} and *Apoe*^{-/-}*Ager*^{-/-} mice to a sham operation (controls) or surgically-induced CKD. Twelve weeks after surgery, we retrieved the serum, heart valves, and aortas from the two groups of animals. Serum was used to analyze biochemical variables and the concentration of RAGE ligands. The induction of CKD in *Apoe*^{-/-} mice was associated with a significant increase in urea, calcium, cholesterol,

and triglyceride concentrations, as previously described²⁸. We observed similar trends in CKD *Apoe*^{-/-}*Ager*^{-/-} mice (Table 1).

We measured the concentration of two well identified RAGE ligands: the advanced glycation end product, Carboxymethyllysine (CML) and calgranulin, an S100 protein in the serum of sham-operated or uremic *Apoe*^{-/-} mice to analyze potential activation of the RAGE axis. Both Carboxymethyllysine and S100 protein concentrations were significantly higher in the serum of CKD *Apoe*^{-/-} mice than that of sham-operated mice (0.99 ± 0.1 vs 0.55 ± 0.07 mmol/mol lysine for CML, $p < 0.01$ and 45 ± 3.11 vs 23 ± 5.76 pg/ml for S100, $p < 0.01$, respectively) (figure 1A & 1B).

We measured RAGE ligand and *Ager* mRNA levels in the aortic vessels retrieved from CKD and sham-operated *Apoe*^{-/-} mice to further analyze the potential role of RAGE signaling in the vasculature. The CML concentrations were higher in the vessels of CKD mice than in those of sham-operated mice (1.14 ± 0.2 vs 0.65 ± 5.76 mmol/mol lysine, $p < 0.01$; figure 1C). In addition, *Ager* mRNA levels were also four-fold higher in CKD vessels (figure 1D).

These results show that CKD is associated with the accumulation of RAGE ligands and increased expression of RAGE in the vasculature, suggesting a potential role for this receptor in the vascular changes associated with CKD.

Deletion of RAGE protects against uremia-induced vascular calcifications and vascular expression of Runx2 *in vivo*.

Vascular calcification is a pathogenic feature of uremic vasculopathy. We subjected *Apoe*^{-/-} and *Apoe*^{-/-}*Ager*^{-/-} mice to a sham operation or CKD induced-operation and analyzed the aortic valves by Von Kossa staining 12 weeks after surgery to analyze the role of RAGE in this process. The surface of the valve positively stained by Von Kossa and therefore affected by

calcification was quantified and compared in each group. The induction of CKD in *Apoe*^{-/-} mice was associated with a significant increase in vascular calcification ($12 \pm 0.89\%$ vs $0.45 \pm 0.08\%$ for sham-operated mice, $p < 0.0001$) (Figure 2A and 2B). The induction of CKD in *Apoe*^{-/-}*Ager*^{-/-} mice was associated with a modest but significant increase in vascular calcification relative to sham-operated mice ($3 \pm 0.52\%$ vs $0.56 \pm 0.01\%$, $p < 0.01$). However, the calcified valvular surface of CKD *Apoe*^{-/-}*Ager*^{-/-} mice was significantly lower than that of CKD *Apoe*^{-/-} mice ($p < 0.0001$) (Figure 2A and 2B).

To further confirm these findings we eluted the calcium from whole aortas of animals of each group and quantified the calcium content. As expected we found significant increase in calcium content in uremic *Apoe*^{-/-} group compared to sham *Apoe*^{-/-} animals (1.35 ± 0.08 vs 0.96 ± 0.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry tissue, $p < 0.05$). Interestingly, induction of uremia did not increase aortic calcium content in *Apoe*^{-/-}*Ager*^{-/-} mice (1.08 ± 0.06 for sham vs 1.09 ± 0.07 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry tissue for uremic aortas, NS) (Figure 2D)

Osteoblast transformation of smooth muscle cells is an important mechanism of the active cellular process. We therefore examined the expression of osteoblast transcription factor, Runx2, in the aortas of sham-operated or CKD *Apoe*^{-/-} and *Apoe*^{-/-}*Ager*^{-/-} mice. Compared to sham operated animals, CKD induced a significant increase in the level of Runx2 mRNA in *Apoe*^{-/-} mice but not in CKD *Apoe*^{-/-}*Ager*^{-/-} mice (1.4 ± 0.07 vs 0.62 ± 0.01 Arbitrary Units (AU), $p < 0.001$, respectively) (Figure 2E).

These results suggest that RAGE signaling is involved in the genesis of vascular calcification via the potential transformation of VSMCs into osteoblasts in vascular walls.

RAGE is involved in matrix mineralization of VSMCs *in vitro*

We established primary cultures of *Ager*^{+/+} or *Ager*^{-/-} VSMCs and stimulated them for 14 days with either vehicle, or S100A12 (20 µg/ml) to examine the influence of RAGE signaling in VSMC-dependent calcification *in vitro*. We quantified calcification by staining the cells with Alazarin red. Pi stimulation (3 or 4 mM) of *Ager*^{+/+} or *Ager*^{-/-} VSMCs was used as positive control for VSMCs-dependent calcification. Stimulation of *Ager*^{+/+} VSMCs with S100A12 or Pi induced significant matrix mineralization relative to control media. The Alizarin red concentrations were as follows: 73 ± 2.48 µM for control media vs 251 ± 25 µM for S100A12, 798 ± 36 µM for 3mM Pi, and 1253 ± 39 µM for 4mM Pi; p < 0.001 for S100A12, 3, and 4 mM Pi relative to control respectively (Figure 3A). In contrast to *Ager*^{+/+} cells, *Ager*^{-/-} VSMCs stimulated with S100A12 showed significantly less calcification (141 ± 40 AU vs 251 ± 25 AU for S100A12 stimulated *Ager*^{+/+} VSMCs; p < 0.05). Interestingly *Ager*^{-/-} VSMCs also exhibited significantly less Pi-induced calcification (350 ± 21.8 µM for 3 mM Pi-stimulated *Ager*^{-/-} VSMCs vs 798 ± 36 µM for 3 mM Pi-stimulated *Ager*^{+/+} VSMCs; p < 0.001 and 450 ± 37 µM for 4 mM Pi-stimulated *Ager*^{-/-} VSMCs vs 1253 ± 39 µM 4 mM Pi-stimulated *Ager*^{+/+} VSMCs, p < 0.001.

We evaluated the role of an additional mechanism involved in vascular calcification, that is, matrix vesicle release, to confirm the role of RAGE in *in vitro* mineralization. Stimulation of *Ager*^{+/+} VSMCs with S100A12 or 4 mM Pi induced significant matrix vesicle release: 3.55 ± 0.99 µg for S100A12 vs 0.56 µg for control media (p < 0.01), and 5.1 ± 0.99 µg for 4 mM Pi (p < 0.001 vs control media) respectively. Stimulation of *Ager*^{-/-} VSMCs with S100A12 resulted in significantly less release of matrix vesicles (1.05 ± 0.29 µg for *Ager*^{-/-} VSMCs vs 3.55 ± 0.99 µg for *Ager*^{+/+} VSMCs). Stimulation of *Ager*^{-/-} VSMC with 4 mM Pi also led to less release of matrix vesicles (1.87 ± 0.44 µg for *Ager*^{-/-} VSMC vs 5.1 ± 0.99 µg for *Ager*^{+/+}

VSMCs) (Figure 3B).

RAGE is involved in the differentiation of VSMCs into osteoblasts *in vitro*

Osteoblast transformation of VSMCs is a central pathogenic mechanism in active vascular mineralization. This phenotypic transformation is associated with increased expression of the transcription-factor Runx2, Collagen1, and Bone Morphogenetic Proteins. We assessed the modulation of these markers at the transcriptional and protein levels using *Ager*^{+/+} or *Ager*^{-/-} VSMCs cultivated for 14 days with either control media or media containing S100A12 (20 μ g/ml) or Pi (3 mM or 4 mM).

Stimulation of *Ager*^{+/+} VSMCs with 3 mM Pi (or 4 mM) significantly increased the mRNA levels of *Runx2* ($x 3.39 \pm 0.46$, $p < 0.005$), Collagen 1 (*Col1a1*) ($x 2.3 \pm 0.27$, $p < 0.001$), and *Bmp2* ($x 44.85 \pm 20$, $p < 0.001$) relative to control media (Figure 4A, 4B and 4C). Runx2, Collagen 1 and BMP2 protein levels were also significantly higher after Pi stimulation (Figure 4D, 4E and 4F). Similarly, S100A12 stimulation of *Ager*^{+/+} VSMCs significantly increased the mRNA levels of *Runx2* ($x 1.75 \pm 0.5$ AU, $p < 0.05$), Collagen 1 ($x 2.27 \pm 0.18$, $p < 0.01$), and BMP2 ($x 38.9 \pm 9.62$ AU, $p < 0.05$) relative to control media (Figure 4A, 4B and 4C). In agreement, Runx2, Collagen 1, and BMP2 protein levels were also significantly higher after S100A12 stimulation (Figure 4D, 4E and 4F). These results suggest that RAGE signaling may induce osteoblast differentiation of VSMCs. The role of RAGE in the differentiation of VSMC into osteoblasts was further confirmed using *Ager*^{-/-} VSMCs. VSMCs devoid of RAGE were significantly protected against S100A12-induced osteoblast differentiation (Figure 4). Interestingly, the deletion of RAGE was also significantly protective against osteoblast differentiation induced by Pi (Figure 4).

Inhibition of phosphate co-transporters by phosphonoformic acid prevents RAGE-mediated VSMC calcification *in vitro*

Our results suggest that the deletion of *Ager* prevents VSMC-dependent active mineralization induced not only by RAGE ligands, but also by inorganic phosphate Pi. The phosphate co-transporters Pit-1 and Pit-2 play a central role in the calcification process by allowing the entry of Pi and activation of signaling pathways leading to calcification³⁰. We therefore examined the link between RAGE and phosphate co-transporters. We used phosphonoformic acid, a non-selective pharmacological inhibitor of the phosphate co-transporters, Pit-1 and Pit-2, to test the participation of phosphate co-transporters in S100A12-induced VSMC calcification. We cultured *Ager*^{+/+} VSMCs in control media or media containing S100A12, or Pi (3 or 4 mM) as a positive control, with or without 1mM phosphonoformic acid (PFA) for 14 days. We stained the cells with Alazarin red at various times after initiating the cultures and quantified the color intensity after extraction. Stimulation of *Ager*^{+/+} VSMCs with Pi or S100A12 induced calcification, whereas the addition of PFA to the medium significantly inhibited the calcification process. The Alizarin red concentrations were: S100A12, 211 ± 10.49 µM without PFA vs 44 ± 10.04 µM with PFA, p < 0.001; 3 mM Pi, 403 ± 13 µM without PFA vs 48 ± 14.69 µM with PFA, p < 0.001; respectively (Figure 5A). These results suggest that functional phosphate co-transporters are required for RAGE-ligand-mediated calcification.

Deletion of RAGE inhibits CKD induced up-regulation of the co-transporter Pit1 expression *in vivo*

It has been previously shown that phosphate uptake through Pit-1 is essential for Pi-induced VSMC calcification and phenotypic transformation³¹. We analyzed Pit-1 mRNA levels in the aortas of *Apoe*^{-/-} and *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} mice to examine the link between RAGE and phosphate

co-transporter Pit-1 *in vivo*. Pit-1 mRNA levels were significantly lower in sham-operated *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} mice than in sham-operated *Apoe*^{-/-} mice (respectively, 0.48 ± 0.01 AU vs 1.0 AU; $p < 0.05$). The induction of CKD in *Apoe*^{-/-} mice was associated with a significant increase in Pit-1 mRNA levels ($x 1.32 \pm 0.07$, $p < 0.05$; Figure 5B). In contrast, CKD did not modify Pit-1 mRNA levels in *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} mice (0.53 ± 0.12 AU for uremic *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} vs 0.48 ± 0.01 AU for sham-operated *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} mice, NS).

RAGE is involved in the up-regulation of the co-transporter Pit1 *in vitro*

We next tested the effect of the RAGE ligand, S100A12, on Pit-1 expression in VSMCs *in vitro*. We stimulated *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs with control media or media containing S100A12 (20 μ g/ml) or 3 mM Pi for seven days. We analyzed Pit-1 mRNA and protein levels at various times after initiating the cultures. As expected³⁰, stimulation of *Ager*^{+/+} VSMCs with 3 mM Pi induced a significant increase of Pit-1 mRNA levels relative to control media: ($x 3.81 \pm 0.7$ AU; $p < 0.01$; Figure 5C). Stimulation of these cells with S100A12 also induced a significant increase in Pit-1 mRNA levels ($x 2.82 \pm 0.04$ AU; $p < 0.001$). Deletion of RAGE significantly prevented S100A12- and Pi-induced increases of Pit-1 mRNA levels: 0.67 ± 0.40 AU for S100A12, $p < 0.02$ vs *Ager*^{+/+} cells; 1.01 ± 0.09 AU for 3 mM Pi, $p < 0.01$ vs *Ager*^{+/+} cells, respectively (Figure 5C).

The analysis of Pit-1 protein expression in *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs confirmed the results obtained by mRNA analysis, with a significant increase of Pit-1 protein levels in *Ager*^{+/+}, but not in *Ager*^{-/-} VSMCs, after stimulation with S100A12 or Pi (Figure 5D).

RAGE mediated oxidative stress is involved in the regulation of Pit-1 expression in VSMCs *in vitro*

We further examined the mechanisms involved in RAGE-mediated Pit-1 regulation. We first tested reactive oxygen species (ROS) generation. We stimulated *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs with 4 mM Pi or S100A12, and measured intracellular ROS levels using a fluorescent dye. Both 4 mM Pi and S100A12 induced a significant increase of ROS production in *Ager*^{+/+} VSMCs: 9.34 ± 0.45 AU for control media vs 21.10 ± 1.57 AU for 4 mM Pi, p < 0.0001 and 13.60 ± 0.23 AU for S100A12, p < 0.01. ROS production was significantly lower in *Ager*^{-/-} VSMCs than *Ager*^{+/+} VSMCs: 10.52 ± 0.09 AU for 4 mM Pi and 6.00 ± 0.07 AU for S100A12, p < 0.001 (Figure 6A).

We stimulated *Ager*^{+/+} VSMCs with Pi or S100A12, with or without NAC (10 mM), to test the link between oxidative stress and Pit-1 expression. After seven days of culture, we prepared cell lysates and measured Pit1 and Runx2 protein levels by immunoblotting. NAC completely inhibited Pi- and S100A12-induced Pit-1 protein upregulation. We observed a similar effect on Runx2 protein levels (Figure 6B), suggesting that RAGE-induced differentiation of VSMCs into osteoblasts is mediated by ROS production.

Inorganic phosphate-mediated oxidative stress is involved in S100A12 production by VSMC *in vitro*

We next tested whether stimulating VSMCs with Pi induces the production of RAGE ligands in the supernatant. Stimulation of *Ager*^{+/+} VSMCs with 4 mM Pi for seven days resulted in a significant increase in S100 protein concentration in the cell supernatant: 12.0 ± 0.2 pg/ml for control media vs 19.00 ± 0.97 pg/ml for 4 mM Pi, p < 0.001, respectively. The level of CML, another RAGE ligand, in the supernatant of Pi-stimulated VSMCs did not significantly

increase (Figure 6D).

We used NAC (10 mM) to test the role of oxidative stress on the production of RAGE ligands triggered by Pi stimulation. Stimulation of *Ager*^{+/+} VSMC with Pi in the presence of NAC significantly inhibited the Pi-induced increase of S100 protein levels in the supernatant 14.00 ± 1.15 pg/ml with NAC vs 19.00 ± 0.97 pg/ml without NAC, p < 0.01, respectively (figure 6C). This suggests that oxidative stress in *Ager*^{+/+} VSMC induced by Pi stimulation is responsible for the production of RAGE ligands in the supernatant.

Taken together, these results suggest that: (1) stimulation of *Ager*^{+/+} VSMCs with either Pi or RAGE ligands is followed by significant ROS production; (2) RAGE mediated oxidative stress is involved in Pit-1 and Runx2 upregulation; and (3) Pi is able to induce the production and release of RAGE ligands into the supernatant of VSMCs. A schematic representation of this hypothesis is shown in figure 7.

DISCUSSION

Cardiovascular disease is the leading cause of death in patients with ESRD^{1, 4}. This cardiovascular burden is related to specific changes of the CKD vasculature, characterized by extensive atherosclerosis and arteriosclerotic lesions^{5, 13}. Arterial calcification in the medial layer of the vessels is the main feature of arteriosclerotic lesions. This calcification results from an active VSMC-dependent mineralization process^{6, 10, 12, 32}.

CKD is characterized by the retention of various solutes that would normally be excreted by the kidneys. Those able to interfere with biological functions are called uremic toxins^{17, 33, 34}. Approximately 150 substances have been identified as toxins, including advanced glycation end products, such as carboxymethyl lysine and pentosidine. These interact with their specific receptor, the receptor for advanced glycation end products, RAGE.

RAGE is a multi-ligand receptor of the immunoglobulin superfamily involved in fundamental disease processes characterized by vascular pathology^{21, 23, 35-40}. Vascular stress leads to up-regulation of RAGE ligands, such as S100B, advanced glycation end products (AGEs), and high mobility group box 1 (HMGB1), in the vessel wall. This facilitates their interaction with RAGE, leading to its activation and to the induction of pro-inflammatory and tissue-damaging responses⁴¹.

Recent data from the literature suggest that RAGE signaling may also be involved in the vascular changes induced by CKD such as accelerated atherosclerosis. Bro *et al.* first reported that the administration of a neutralizing anti-RAGE antibody to uremic *Apoe*^{-/-} mice for 12 weeks led to a significant reduction of the surface area of atherosclerotic lesions relative to isotype control treated animals²⁷. This protective effect of the inhibition of RAGE signaling was confirmed by our group²⁶. In this latter study, the atherosclerotic lesion surface area of uremic *Apoe*^{-/-} mice were compared to those of uremic *Apoe*^{-/-RAGE}^{-/-} animals, showing that the *Apoe*^{-/-RAGE}^{-/-} mice had a significantly smaller atherosclerotic lesion surface area²⁶. Altogether, these publications suggest that CKD is a pathogenic condition leading to the accumulation of RAGE ligands and a subsequent increase in the activation of RAGE signaling. RAGE may therefore be a central player in CKD-mediated vascular changes.

Vascular calcification is another key feature of CKD vasculopathy. We aimed to determine whether the deletion of RAGE was also protective against the CKD vascular calcification process. In the present study, we used a well-characterized model of CKD vasculopathy and found that the induction of uremia in *Apoe*^{-/-} mice promoted vascular calcification, and stimulated the expression of RAGE and RAGE ligands, suggesting that the signaling pathway elicited by this pro-inflammatory receptor is involved in the development

of vascular calcification. We further strengthened this finding using animals in which RAGE gene was deleted, which exhibited significantly less vascular calcification.

Our results are in agreement with previous publications. Several reports of clinical studies on dialyzed patients and of animal models of vascular calcification have highlighted the deleterious role of RAGE in the calcification process. In patients, there is a negative correlation between soluble forms of RAGE (soluble RAGE (sRAGE) or endogenous secretory RAGE (esRAGE)) and vascular calcification scores^{42, 43}. This suggests that in CKD, lower concentrations of soluble RAGE may favor the interaction of RAGE ligands with the full-length and pro-inflammatory form and induce and promote calcification. Hofmann *et al.*, reported that over expression of the RAGE ligand, S100A12, in VSMCs of *Apoe*^{-/-} mice significantly increased the vascular calcification surface area, whereas the administration of sRAGE, as a decoy to minimize the RAGE-S100A12 interaction, was protective. Similar findings were reported after the induction of CKD in *Apoe*^{-/-} mice overexpressing S100A12 in VSMCs^{44, 45}. Wang *et al.*, reported similar findings in a diabetic mouse model of vascular calcification⁴⁶. Altogether, these studies support a deleterious role for RAGE signaling in the vascular calcification process in mice. In the present study, we confirmed the importance of RAGE signaling in the CKD calcification process. We were also able to decipher the specific steps in which RAGE signaling is essential by using animals lacking functional RAGE.

In the second part of our study, we used primary cultures of *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs and showed that RAGE signaling mediates the transformation of these cells into osteoblasts. This is in agreement with previous publications using either human, rat, or mouse aortic VSMCs stimulated *in vitro* with RAGE ligands, such as AGEs or HMGB1⁴⁷⁻⁵¹.

A unique finding of our study is the protective effect of RAGE deletion against inorganic phosphate mediated osteoblast differentiation of VSMCs, suggesting crosstalk

between RAGE and Pi-signaling pathways. To further characterize the mechanisms involved in this crosstalk, we analyzed the role of oxidative stress. We found that ROS generation was an important step that occurs early in both RAGE ligand/RAGE- and Pi-mediated osteoblast differentiation of VSMCs. We also found that oxidative stress was involved in the upregulation of the expression of the sodium phosphate co-transporter, Pit1, following either Pi or RAGE ligand/RAGE signaling, suggesting that regulation of Pit-1 expression is the common step between RAGE- and Pi-mediated osteoblast transformations of VSMCs.

Pi stimulation of VSMCs induces the generation of superoxide anions, hydrogen peroxide, and mitochondrial ROS^{6, 52}. This ROS production is involved in the phenotypic changes of these cells⁵³. RAGE-mediated oxidative stress has also been widely reported^{24, 26, 54}. RAGE activation induces both the assembly of the NADPH oxidase at the membrane and mitochondrial ROS production⁵⁵. Invalidation of RAGE is protective in several inflammatory or ischemic conditions mainly through the reduction of the oxidative stress^{55, 56}. We previously reported RAGE-mediated redox regulation of VSMC migration and activation in response to SAA stimulation²⁶. Here, we report a RAGE-mediated redox regulation of Pit-1 expression leading to phenotypic changes of VSMCs. The generation of ROS has been previously reported to be involved in VSMC mineralization *in vitro*^{52, 53}, but, the link with Pit-1 expression was not established. In the present study, we report that RAGE signaling induces redox regulation of Pit-1 expression and that upregulation of Pit-1 is a key step for not only RAGE ligand-, but also Pi-induced transformation of VSMCs into osteoblasts.

Active transport of phosphate into cells is primarily mediated by three classes of sodium-dependent phosphate (NaPi) co-transporters, classified based on structure, tissue expression, and regulation. The type I and type II sodium-dependent phosphate co-transporters are expressed predominantly in kidney and intestinal epithelium. Among them, members of type II family (NaPi-2 to NaPi-7) are highly involved in renal and intestinal phosphate absorption

and play an important role in the maintenance of serum phosphate homeostasis. Type III sodium-dependent phosphate co-transporters (SLC20 family), comprising Pit-1 and Pit-2, are expressed in many tissues and are involved in osteoblast differentiation of VSMCs^{6, 30, 31, 57, 58}.

Phosphate uptake through Pit-1 is involved not only in human, but also in rat and murine VSMC-mediated matrix calcification⁵⁸⁻⁶⁰. The central role of Pit-1 has been demonstrated by modulating its expression and studying the downstream effects on mineralization. For example, pharmacological inhibition of Pit-1, or down-regulation of its expression using interfering RNAs, inhibits the phenotypic transition of VSMCs to osteoblasts^{59, 60}. In contrast, overexpression of Pit-1 induced by *in vitro* stimulation with pro-calcifying agents results in increased matrix calcification. In addition, CKD vessels in patients exhibit increased amounts of Pit-1 protein at the sites of intense calcification relative to non-CKD vessels³⁰. Thus, increased phosphate transport through Pit-1 is a key step in the mineralization process. Downstream effects of Pit-1 include the induction of Runx2/cbfa1 and osteopontin transcription^{31, 60}.

Further studies are needed to delineate the mechanisms and the signaling pathways involved in RAGE/Pi signaling cross-talk. We report that the rapid production of RAGE ligands by VSMCs in response to Pi induces the activation of RAGE signaling. This acts as an amplifier of oxidative stress leading to the upregulation of Pit-1 transcription and protein expression. Thus, the deletion of RAGE may have a more pronounced protective effect beyond the simple inhibition of the RAGE/RAGE ligands interaction and RAGE antagonism may prevent Pi-mediated mineralization. Pharmacological strategies targeting RAGE may be of great interest in slowing the progression of CKD vascular calcification.

The relevance of our findings for the calcification process in humans is yet to be established, but these results in animal models provide a strong basis for future clinical studies. New pharmacological inhibitors of RAGE will soon be available and will help in the evaluating the contribution of the RAGE axis characterized in rodent models of CKD vascular calcification and the potential benefit of anti-RAGE strategies in treating vasculopathy in CKD patients.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male apolipoprotein E knockout (*Apoe*^{-/-}) mice on a C57BL/6 background were purchased from Charles River Laboratories® (l'Arbresle, France). *Apoe*^{-/-} *Ager*(RAGE)^{-/-} mice were generated using a backcross-intercross scheme in the animal facility of New York University (Dr Schmidt)⁴⁰. Embryos from the F3 generation were rederived and mice arising from the rederivation process transferred to the animal facility of Reims France (IFR53 Pôle Santé, Reims, France). Animals were housed in a barrier- and pathogen-free animal facility with a 12 h light-dark cycle and fed a regular chow diet. All experiments were approved by the ethics committee for animal care and use of Reims Champagne Ardenne (CEEA-RCA-56). The number of mice per experiment is indicated in the figure legends.

Induction of uremia

Eight-week old male *Apoe*^{-/-} or *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} mice were randomly assigned to CKD or sham-operated groups (Sham). A two-step surgical procedure was used to induce CKD as previously described²⁸. Surgery was performed under xylazine (Rompun 2%; Bayer, Leverkusen, Germany) (6 µg/g of body weight) and ketamine (Clorketam 1000; Vetoquinol SA, Lure, France) (120 µg/g of body weight) anesthesia. The approach consisted of the cautery of renal mass on one side followed by contralateral uninephrectomy of the remaining

kidney one week later to achieve a total 5/6 nephrectomy. Control animals underwent sham operations involving the decapsulation of both kidneys. Two weeks after surgery, blood was collected and urea concentrations were assessed in the two groups. Urea concentrations were significantly higher in uremic animals than in sham-operated mice. All mice were sacrificed under anesthesia (ketamine and xylazine) 12 weeks after surgery, the blood collected, and the arterial tree perfused *in situ* with PBS (under a pressure of 100 mm Hg) for 10 min via a cannula in the left ventricular apex. The heart plus aortic root was excised and stored in optimum cutting temperature (OCT) compound at -80°C. Aortas were dissected and incubated in RNAlater (Qiagen, Austin TX, USA). The blood was centrifuged and the serum aliquoted and stored -80°C.

Measurement of biochemical parameters in the sera

Serum concentrations of urea, total cholesterol, triglycerides, calcium, and phosphorus were measured using a Hitachi 917 autoanalyzer (Roche, Meylan, France)²⁸.

Measurement of RAGE ligands

S100 protein concentrations were measured using commercially available ELISA Kits following the manufacturer's instructions (My biosource, San Diego, CA.). For serum AGE measurements, carboxymethyllysine (CML) was measured in plasma samples using mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC/MS/MS). Total AGEs (free adducts and protein-linked) were measured⁶¹.

Histology

Vascular calcifications in the aortic root were evaluated by von Kossa staining in cryosections of aortic tissue. Briefly, the cryosections were incubated in 5% silver nitrate solution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) for 30 min in the dark, followed by incubation in revelator solution

(Kodak) for 5 min and fixation in 5% sodium-thiosulfate solution for another 5 min. Finally, cryosections were stained with 2% eosin. Calcium deposits appeared as black objects on a bright red background of surrounding tissue. Calcium deposits were measured using Image-J software (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA) and were expressed as the proportion of the aortic valve surface occupied by calcium deposition relative to the total area of the valve.

Measurement of Calcium content of Aortas

Calcium was eluted from desiccated aorta in 1mL of HCl (6N) into sealed glass flasks. Samples were hydrolyzed for 5 days at 110°C. Hydrolyzates were then centrifuged (15,000g for 5 min), and 1mL of supernatant was evaporated to dryness under nitrogen stream. Dried hydrolyzates were resuspended in 100µL of HCL 0,6N. Assay of eluate calcium content used a Cresolphthalein complexone method (Calcium Kit; Sigma-Aldrich, Lyon, France), according to the manufacturer's instructions, and values were corrected for dry tissue weight.

Vascular Smooth Muscle cell isolation

Ager^{+/+} and *Ager^{-/-}* VSMCs were isolated from the aortas of 10-week-old male mice and cultured according to an explant protocol consistent with institutional guidelines ²⁴. Mice were anesthetized using a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The aorta from the subclavian branch to the renal bifurcation was aseptically excised from the animal and placed in ice-cold PBS. After removal of the peri-aortic fat, the vessels were incubated at 37°C for 25 min in a cocktail of DMEM, antibiotics, 1% collagenase, and 1% soybean trypsin inhibitor. The digested vessels were carefully cut into small pieces and plated in 6-well tissue culture plates for at least 7 days in DMEM with 10% FBS, antibiotics/antimycotics, and 2

mM glutamine to induce smooth muscle cell proliferation. Cultures were composed of more than 95% α -SMA positive cells according to immunostaining. Experiments were conducted on VSMCs between passage 4 and passage 10.

Cell culture and *in vitro* calcification of VSMCs

Osteoblast differentiation was studied by culturing *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs for the indicated time, at a density of 1×10^4 cells/cm² (day 0) in 10% FBS–DMEM medium, containing either 3 or 4 mM inorganic phosphate (Pi) or RAGE ligand recombinant S100A12 at 20 μ g/ml or the indicated concentration. In some experiments, we used the specific inhibitor of sodium-dependent phosphate cotransporters, phosphonoformic acid (PFA, 1mM), or a potent antioxidant N-Acetyl-Cysteine (NAC) at 10nmol/L (Sigma-Aldrich, Lyon, France). VSMCs were subjected to staining with alizarin red, RNA extraction or protein analysis after the indicated time of treatment.

Alizarin red staining and quantification

Alizarin red staining and quantification were performed according to the manufacturer's instructions (ECM 815, Millipore, Darmstadt,Germany). Briefly, VSMCs were seeded on a 24-well tissue culture plate, treated for the indicated time with the indicated effectors, fixed with 10% formaldehyde at room temperature for 15 min, and incubated in 2% Alizarin red staining solution for 20 min. Excess dye was removed and the cells were washed four times with PBS. For quantification, Alizarin red staining was extracted by adding 10% acetic acid solution to each well. After incubation and heating to 85°C for 10 min, the pH was neutralized to a range of 4.1- 4.5 and absorbance read at 405 nm.

Isolation and characterization of matrix vesicles

Matrix vesicles (MVs) were obtained from cell supernatants by ultracentrifugation as previously described [3]. Briefly, *Ager^{+/+}* and *Ager^{-/-}* VSMCs were cultured for 7 days in DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) containing 10% FBS and treated with Pi or S100A12. At the indicated times, the cell supernatant was decanted and centrifuged at 3000 x g for 10 min to pellet cell debris and apoptotic bodies. The supernatant containing MVs was then centrifuged at 100,000 x g (Beckman Coulter Optima L-90 K ultracentrifuge, Brea, CA, USA) for 1 h at 4 °C. The MV pellets were lysed in 60 µL ice-cold lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) containing protease inhibitors, and the protein content determined using a Biorad Kit (Bio Rad laboratories, Hercules, CA, USA). An increase in the protein concentration indicates an increased number of MVs. MV release was assessed by total protein content. To confirm the protein measurement, 20 µL of the suspension for each condition were used for western blot analysis of actin content.

RNA extraction and RT-PCR

Aortas were removed from RNAlater (Qiagen, Austin, Tx, USA), the tissue samples ground to a fine powder in liquid nitrogen, and incubated in lysis buffer (Qiagen, Austin, Tx, USA). Total RNA was extracted using the RNAeasy Mini kit Plus® (Qiagen, Austin, Tx, USA) according to the manufacturer's instructions.

The same protocol was used to extract RNA from *Ager^{+/+}* and *Ager^{-/-}* VSMCs treated with Pi or S100A12 for different times. RNA purity was determined by Agilent RNA 6000 Nano Chip. First-strand cDNA was synthesized using the first strand synthesis kit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA).

The relative amounts of RAGE, BMP2, COL1A1, Runx2 (Cbfa1), SLC20A1 (PIT-1), and SLC20A2 (PIT-2) mRNA were determined by quantitative real-time PCR. EF1a was used as

a reference gene. The primer sequences used in our study were as follows: RAGE: 5'ggacccttagctggacttagat3' and 5'gagtcccgctcagggtgtct3', EF1a: 5'ctggagccaagtgctaataatgcc3' and 5'ccaggcttgagaacaccaggc3' (Eurofins, Ebersberg, Germany), BMP2: 5'cacacagggacacaccaacc3' and 5'caaagacctgctaattcctcac3', Col1A1: 5'aacctggtgcgaaaggta3' and 5'aggagcaccaacgttaccaa3', Runx2 (Cbfa1): 5'tccacaaggacagagtcagattacag3' and 5'cagaagtcagaggtggcagtgtcate3', SLC20A1: 5'ctcccttgtcggtcat3' and 5'aagaggttgattccgattgtgc3' and SM22: 5'aaggcttggcggttggaa3' and 5'gtggtgagccaagcagactt3'.

All PCR reactions were performed in triplicate. Data are presented as the means ± SD.

Western blotting

Ager^{+/+} and *Ager^{-/-}* VSMCs were stimulated with Pi or S100A12 for the indicated times. The cells were harvested and lysed in ice-cold lysis buffer (Cell Signaling Technology) containing protease inhibitors. Particulate material was removed by centrifugation and the protein concentration determined by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories). Equal amounts of total proteins (10–30 µg/sample) were subjected to SDS-PAGE (7.5–12%) followed by electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes. Nonspecific binding was blocked by the incubation of membranes with nonfat dry milk (5%) for 1 h. The membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies: anti-Runx2 (rabbit monoclonal, at 1/1,000, Cell Signaling Technology), anti-COL1A1 (rabbit, at 1/2,000 Rockland Antibodies & assays, Gilbertsville, Pennsylvania, USA), anti-BMP2 (rabbit, at 1/1,000 Abcam, Cambridge, UK), anti-PIT-1 (rabbit, at 1/1,000 Novus Biologicals, Abingdon, UK), and anti-β-actin (mouse, at 1/10,000 BD Biosciences, San Diego, CA). Primary antibodies were detected with HRP-conjugated donkey anti-rabbit or anti mouse IgG secondary antibody (1:5,000, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and developed using ECL plus detection

reagents (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Densitometry analysis was performed using Quantity One image acquisition and analysis software (Bio Rad lab).

Detection of Reactive Oxygen Species

Ager^{+/+} and *Ager^{-/-}* VSMCs were seeded on chamber slides (Nunc, Roskilde, Denmark) for 24h and then incubated in the presence or absence of Pi (4 mmol/L) or S100A12 (20 µg/ml) for 30 min. The cells were stained with 5 µmol/L CellROX Deep Red reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in complete medium for 30 min at 37°C, followed by three washes with PBS. Fluorescence was visualized in living cells using a temperature and CO₂-controlled inverted microscope (Zeiss, Oberkochen Germany). Reactive oxygen species (ROS) were detected (excitation wave: 644 nm and emission wave: 665 nm) and quantified using ImageJ® software. The fluorescent intensity of each cell was measured and the mean fluorescent intensity of each condition (*i.e.* the sum of the fluorescence of each cell divided by the number of cells counted) is represented in the corresponding image.

Statistical analysis

In all experiments, unless otherwise indicated, data are reported as the means ± SD of at least three replicates per group. Data were analyzed by post hoc comparisons using a 2-tailed t test, and a p value ≤0.05 was considered significant. Statistical comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA).

Disclosure

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Rong LL, Yan SF, Wendt T, *et al.* RAGE modulates peripheral nerve regeneration via recruitment of both inflammatory and axonal outgrowth pathways. *Faseb J.* 2004; 18:1818-1825.
2. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998; 32:S112-119.
3. Parfrey PS, Foley RN. The clinical epidemiology of cardiac disease in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10:1606-1615.
4. Ortiz A, Covic A, Fliser D, *et al.* Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *Lancet.* 2014; 383:1831-1843.
5. Drueke TB, Massy ZA. Atherosclerosis in CKD: differences from the general population. *Nat Rev Nephrol.* 2010; 6:723-735.
6. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, *et al.* Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res.* 2011; 109:697-711.
7. Tonelli M, Karumanchi SA, Thadhani R. Epidemiology and Mechanisms of Uremia-Related Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2016; 133:518-536.
8. Amann K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3:1599-1605.
9. Noordzij M, Cranenburg EM, Engelsman LF, *et al.* Progression of aortic calcification is associated with disorders of mineral metabolism and mortality in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;
10. Shroff R, Long DA, Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2013; 24:179-189.
11. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, *et al.* Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension.* 2001; 38:938-942.

12. Moe SM, Chen NX. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19:213-216.
13. Goodman WG, London G, Amann K, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2004; 43:572-579.
14. Zhang Y, Safar ME, Iaria P, et al. Cardiac and arterial calcifications and all-cause mortality in the elderly: the PROTEGER Study. *Atherosclerosis.* 2010; 213:622-626.
15. Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in CKD-evidence for premature ageing? *Nat Rev Nephrol.* 9:661-670.
16. Moe SM, Duan D, Doeble BP, et al. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int.* 2003; 63:1003-1011.
17. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, et al. A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19:863-870.
18. Wagner Z, Molnar M, Molnar GA, et al. Serum carboxymethyllysine predicts mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2006; 47:294-300.
19. Isoyama N, Leurs P, Qureshi AR, et al. Plasma S100A12 and soluble receptor of advanced glycation end product levels and mortality in chronic kidney disease Stage 5 patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2015; 30:84-91.
20. Nakashima A, Carrero JJ, Qureshi AR, et al. Effect of circulating soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and the proinflammatory RAGE ligand (EN-RAGE, S100A12) on mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5:2213-2219.
21. Stinghen AE, Massy ZA, Vlassara H, et al. Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27:354-370.
22. Schmidt AM, Hori O, Cao R, et al. RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes.* 1996; 45 Suppl 3:S77-80.
23. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, et al. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest.* 2001; 108:949-955.
24. Toure F, Fritz G, Li Q, et al. Formin mDia1 mediates vascular remodeling via integration of oxidative and signal transduction pathways. *Circ Res.* 2012; 110:1279-1293.

25. Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, *et al.* Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J Clin Invest.* 2003; 111:959-972.
26. Belmokhtar K, Robert T, Orillon J, *et al.* Signaling of Serum Amyloid A Through Receptor for Advanced Glycation End Products as a Possible Mechanism for Uremia-Related Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36:800-809.
27. Bro S, Flyvbjerg A, Binder CJ, *et al.* A neutralizing antibody against receptor for advanced glycation end products (RAGE) reduces atherosclerosis in uremic mice. *Atherosclerosis.* 2008; 201:274-280.
28. Massy ZA, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, *et al.* Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:109-116.
29. Massy ZA, Slama M, Tribouilloy C, *et al.* Animal models--what they can tell us about vascular calcification in CKD. *Semin Dial.* 2007; 20:110-112.
30. Jono S, McKee MD, Murry CE, *et al.* Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res.* 2000; 87:E10-17.
31. Lau WL, Festing MH, Giachelli CM. Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. *Thromb Haemost.* 2010; 104:464-470.
32. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, *et al.* 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.* 2004; 15:2857-2867.
33. Duranton F, Cohen G, De Smet R, *et al.* Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23:1258-1270.
34. Gillary P, Jaisson S. Post-translational modification derived products (PTMDPs): toxins in chronic diseases? *Clin Chem Lab Med.* 2014; 52:33-38.
35. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res.* 2010; 106:842-853.
36. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, *et al.* Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature.* 2000; 405:354-360.
37. Yan SD, Chen X, Fu J, *et al.* RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.* 1996; 382:685-691.

38. Deane R, Du Yan S, Submamaryan RK, *et al.* RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 2003; 9:907-913.
39. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, *et al.* Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest.* 2004; 113:1641-1650.
40. Harja E, Bu DX, Hudson BI, *et al.* Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE-/- mice. *J Clin Invest.* 2008; 118:183-194.
41. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. The diverse ligand repertoire of the receptor for advanced glycation endproducts and pathways to the complications of diabetes. *Vascul Pharmacol.* 2012; 57:160-167.
42. Kim HS, Chung W, Kim AJ, *et al.* Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end product are inversely associated with vascular calcification in patients on haemodialysis independent of S100A12 (EN-RAGE) levels. *Nephrology (Carlton).* 2013; 18:777-782.
43. Nasrallah MM, El-Shehaby AR, Osman NA, *et al.* Endogenous soluble receptor of advanced glycation end-products (esRAGE) is negatively associated with vascular calcification in non-diabetic hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol.* 2012; 44:1193-1199.
44. Hofmann Bowman MA, Gawdzik J, Bukhari U, *et al.* S100A12 in vascular smooth muscle accelerates vascular calcification in apolipoprotein E-null mice by activating an osteogenic gene regulatory program. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 31:337-344.
45. Gawdzik J, Mathew L, Kim G, *et al.* Vascular remodeling and arterial calcification are directly mediated by S100A12 (EN-RAGE) in chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 33:250-259.
46. Wang Z, Jiang Y, Liu N, *et al.* Advanced glycation end-product Nepsilon-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes. *Atherosclerosis.* 2012; 221:387-396.
47. Tanikawa T, Okada Y, Tanikawa R, *et al.* Advanced glycation end products induce calcification of vascular smooth muscle cells through RAGE/p38 MAPK. *J Vasc Res.* 2009; 46:572-580.
48. Wang Y, Shan J, Yang W, *et al.* High mobility group box 1 (HMGB1) mediates high-glucose-induced calcification in vascular smooth muscle cells of saphenous veins. *Inflammation.* 2013; 36:1592-1604.

49. Brodeur MR, Bouvet C, Bouchard S, *et al.* Reduction of advanced-glycation end products levels and inhibition of RAGE signaling decreases rat vascular calcification induced by diabetes. *PLoS One*. 2014; 9:e85922.
50. Wei Q, Ren X, Jiang Y, *et al.* Advanced glycation end products accelerate rat vascular calcification through RAGE/oxidative stress. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013; 13:13.
51. Suga T, Iso T, Shimizu T, *et al.* Activation of receptor for advanced glycation end products induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb*. 2011; 18:670-683.
52. Stinghen AE, Chillon JM, Massy ZA, *et al.* Differential effects of indoxyl sulfate and inorganic phosphate in a murine cerebral endothelial cell line (bEnd.3). *Toxins (Basel)*. 2014; 6:1742-1760.
53. Zhao MM, Xu MJ, Cai Y, *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vitro and in vivo. *Kidney Int*. 2011; 79:1071-1079.
54. Daffu G, del Pozo CH, O'Shea KM, *et al.* Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond. *Int J Mol Sci*. 2013; 14:19891-19910.
55. Aleshin A, Ananthakrishnan R, Li Q, *et al.* RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294:H1823-1832.
56. Guo J, Ananthakrishnan R, Qu W, *et al.* RAGE mediates podocyte injury in adriamycin-induced glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19:961-972.
57. Bottger P, Hede SE, Grunnet M, *et al.* Characterization of transport mechanisms and determinants critical for Na⁺-dependent Pi symport of the PiT family paralogs human PiT1 and PiT2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 291:C1377-1387.
58. Chavkin NW, Chia JJ, Crouthamel MH, *et al.* Phosphate uptake-independent signaling functions of the type III sodium-dependent phosphate transporter, PiT-1, in vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res*. 2015; 333:39-48.
59. Crouthamel MH, Lau WL, Leaf EM, *et al.* Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33:2625-2632.
60. Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*. 2006; 98:905-912.

61. Jaisson S, Gillery P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clin Chem*. 2010; 56:1401-1412.

Acknowledgments

We would like to thank Ms Caroline Fichel (Division of Anatomopathology, Reims) and Ms Sabrina Poirot (Inserm U1088, Amiens) for technical assistance. We also thank Ms Leslie Migeon for help in the preparation of the manuscript and Dr Christine Teryn (PICT, Plateforme d’Imagerie Cellulaire et Tissulaire).

Funding

This work was supported by grants from “Fondation Lefoulon Delalande” (to KB) and “Société Francophone de Dialyse” (to FT).

TABLES

TABLE 1: Biochemical parameters of the studied groups

- a: *Apoe*^{-/-} Uremic versus Sham ($p = 1.10^{-7}$)
- b: *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} Uremic versus Sham ($p = 1.10^{-7}$)
- c: *Apoe*^{-/-} Uremic versus Sham ($p = 1.10^{-6}$)
- d: *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} Uremic versus Sham ($p = 1.10^{-5}$)
- e: *Apoe*^{-/-} Uremic versus Sham ($p = 1.10^{-3}$)
- f: *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} Uremic versus Sham ($p = 1.10^{-3}$)

		Urea (mmol/l)	Calcium (mmol/l)	Phosphorus (mmol/l)	Cholesterol (mmol/l)	Triglycérides (mmol/l)
Sham	<i>Apoe</i> ^{-/-} (<i>n</i> =5)	7.6 +/- 0.7	2.1 +/- 0.03	1.9 +/- 0.3	6.8 +/- 0.5	0.8 +/- 0.2
	<i>Apoe</i> ^{-/-} <i>Ager</i> ^{-/-} (<i>n</i> =13)	7.8 +/- 0.4	2.0 +/- 0.06	2.0 +/- 0.6	6.9 +/- 0.9	0.9 +/- 0.1
Uremic	<i>Apoe</i> ^{-/-} (<i>n</i> =5)	25.6 +/- 2.8 ^a	2.4 +/- 0.07 ^c	1.9 +/- 0.2	12.2 +/- 1.7 ^a	1.6 +/- 0.7 ^e
	<i>Apoe</i> ^{-/-} <i>Ager</i> ^{-/-} (<i>n</i> =11)	26.6 +/- 2.3 ^b	2.4 +/- 0.13 ^d	1.8 +/- 0.2	10.8 +/- 1.8 ^b	1.4 +/- 0.4 ^f

LEGENDS

FIGURE 1

CKD promotes the accumulation of RAGE ligands and the transcription of RAGE mRNA.

A. Serum samples were collected from sham-operated and CKD *Apoe^{-/-}* mice 12 weeks after surgery and the CML concentration determined by LC-MS/MS **B.** The concentration of S100 proteins was determined by ELISA in the sera of CKD and sham operated *Apoe^{-/-}* mice. **C.** Aortas from uremic or sham operated mice were collected and pooled (n = 3) to measure CML by LC-MS/MS. **D.** Aortic mRNA expression of RAGE in sham-operated (n = 4) and uremic (n = 4) *Apoe^{-/-}* mice, **p < 0.01.,

FIGURE 2

Deletion of RAGE protects against uremia-mediated induction of the calcification process

A. Representative images of aortic valve sections following von Kossa staining. Magnification x200, scale bar = 300 µm. Aortic valves from sham-operated or CKD *Apoe^{-/-}* mice (n = 5 and n = 13, respectively) (top panel) and from sham-operated or uremic *Apoe^{-/-}* *Ager^{-/-}* mice (n = 5 and n = 11, respectively) (lower panel) were retrieved 12 weeks after surgery and subjected to Von Kossa staining to detect calcifications. **B.** Percentage of calcified surface relative to total valve area. **C.** Representative calcification of the aortas of uremic *Apoe^{-/-}* mice revealed by Red alizarin and Von Kossa staining, Magnification x4, scale bar = 0.5cm. **D.** Quantification of the calcium eluted from the aortas of sham operated or

uremic *Apoe*^{-/-} and *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} mice. **E.** Aortic mRNA expression of RUNX2/cbfa1 in aortas retrieved from sham-operated or CKD *Apoe*^{-/-} mice and from sham-operated or CKD *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} mice. **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

FIGURE 3

RAGE-dependent induction of VSMC matrix mineralization following S100A12 and Pi stimulation

Ager^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs were treated for 7 days with Pi (3 or 4 mM) or the RAGE ligand, S100A12. **A.** Matrix mineralization was visualized with Alizarin Red. Representative images for each condition are shown. For quantification, Alizarin red staining was extracted using 10% acetic acid followed by reading the absorbance at 405 nm allowing calculation of the Alazarin red concentration (μ M), scale bar = 0.5cm. Histograms represent the means \pm SD of at least three independent experiments. **B.** Released matrix vesicles (MV). *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs were cultivated for seven days in the presence of Pi or S100A12. The culture supernatants were then subjected to ultracentrifugation and protein detection (μ g of proteins in 10 μ l of VSCMs supernatants). Results are expressed as the means \pm SD of at least three independent experiments *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

FIGURE 4

RAGE-dependent up-regulation of active calcification markers

Ager^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs were treated with Pi (3 or 4 mM) or the RAGE specific ligand, S100A12 (20 μ g/ml), for seven days. VSCM mRNA levels (top panel) and protein levels normalized to β -actin (lower panel) of active calcification markers: **A.** Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) mRNA, **B.** Type I Collagen (COL1A1) mRNA, **C** bone

morphogenetic protein 2 (BMP2) mRNA, **D.** RUNX2 protein, **E.** Type I Collagen (COL1A1) protein, **F.** bone morphogenetic protein 2 (BMP2) protein. Results are expressed as the means ± SD of at least three independent experiments *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

FIGURE 5

RAGE-dependent expression of Pit-1 induced by S100A12 and Pi stimulation

A. VSMCs were treated with Pi (3 mM or 4 mM) or the RAGE specific ligand, S100A12(20 μ g/ml), for seven days with or without the phosphonoformic acid (PFA), sodium-dependent phosphate cotransporter inhibitor, (PFA.1mM). Representative images of matrix mineralization stained with Alazarin red and Alazarin red quantification (μ M) are shown, scale bar = 0.5cm. Results are expressed as the means ± SD of at least three independent experiments. **B.** Sodium-phosphate cotransporter PIT-1 mRNA levels were measured in the aortas of sham-operated or CKD *Apoe*^{-/-} mice (n = 5 and n = 4, respectively) and sham-operated or CKD *Apoe*^{-/-} *Ager*^{-/-} mice (n = 4 and n = 6, respectively). Results are expressed as the mean ± SD. **C** Sodium-phosphate cotransporter PIT-1 mRNA expression was measured in *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs treated with Pi (3mM) or the RAGE ligand, S100A12 (20 μ g/ml), for seven days. Results are expressed as the means ± SD of at least three independent experiments. **D.** Sodium-phosphate cotransporter Pit-1 protein levels were measured in *Ager*^{+/+} and *Ager*^{-/-} VSMCs treated with Pi (3mM) or the RAGE ligand, S100A12, for seven days. Results are expressed as the mean ± SD of at least three independent experiments. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001,

Figure 1

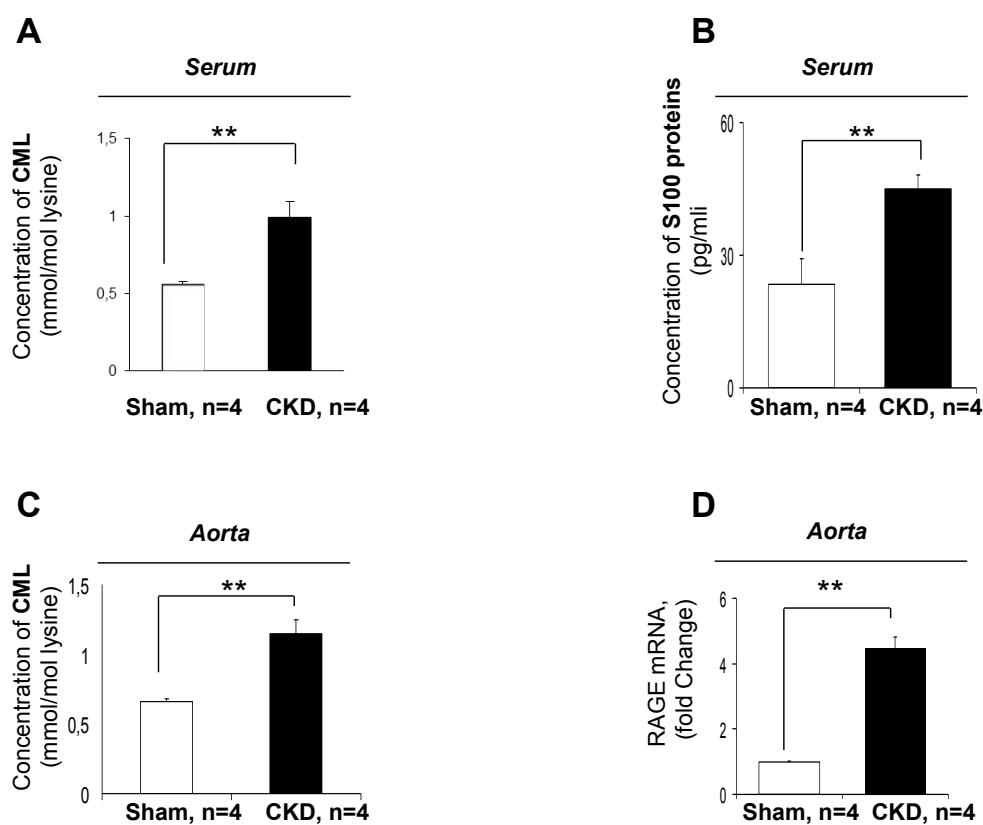


Figure 2

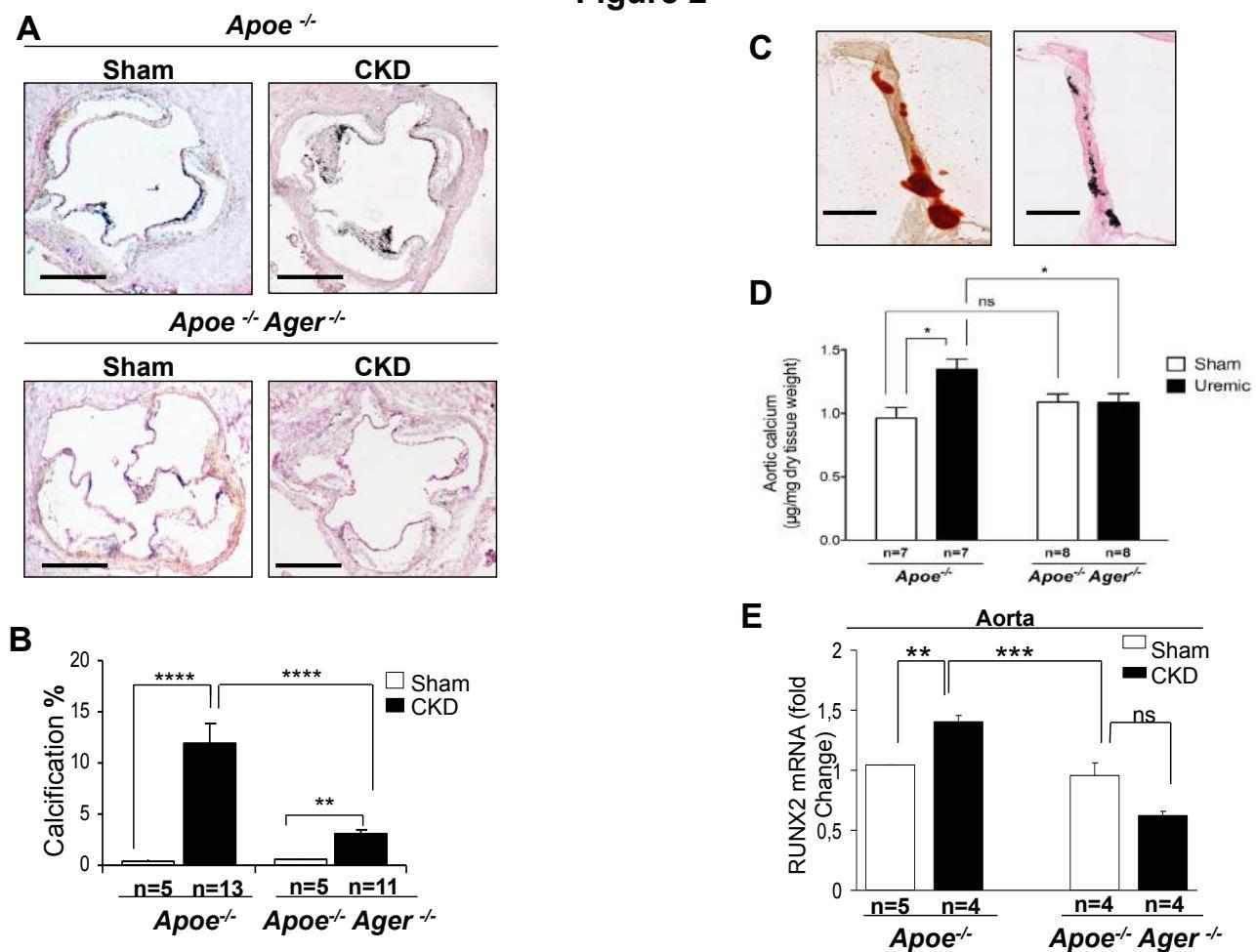


Figure 3

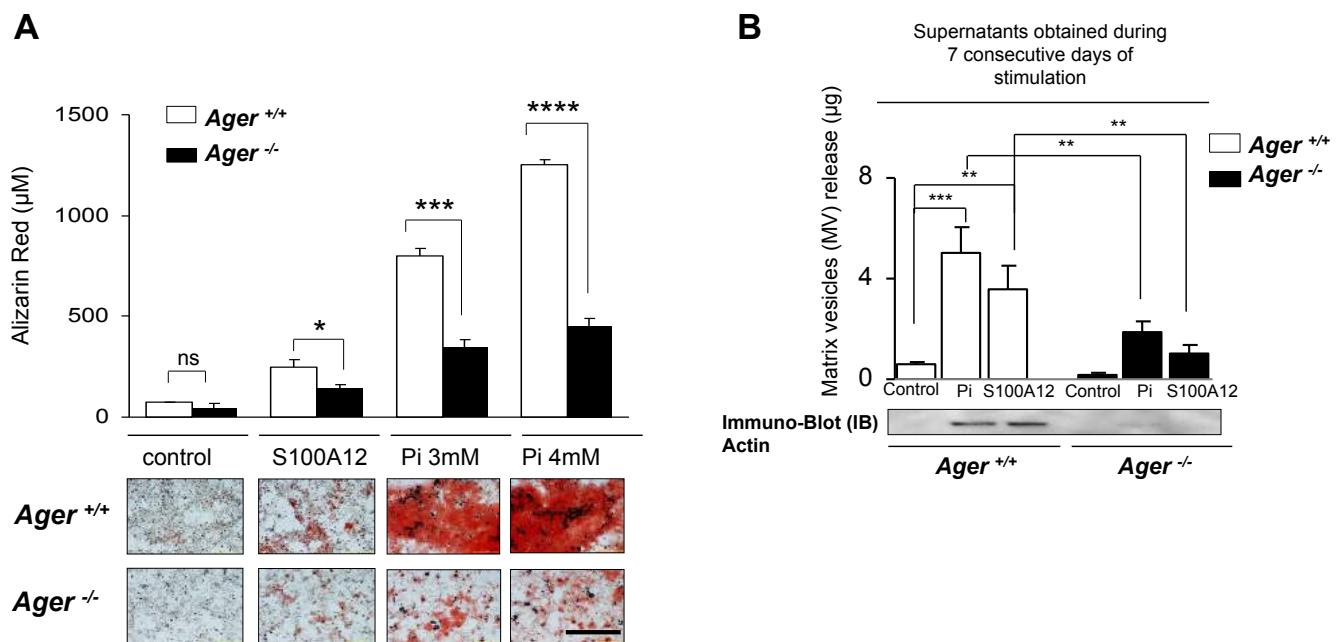


Figure 4

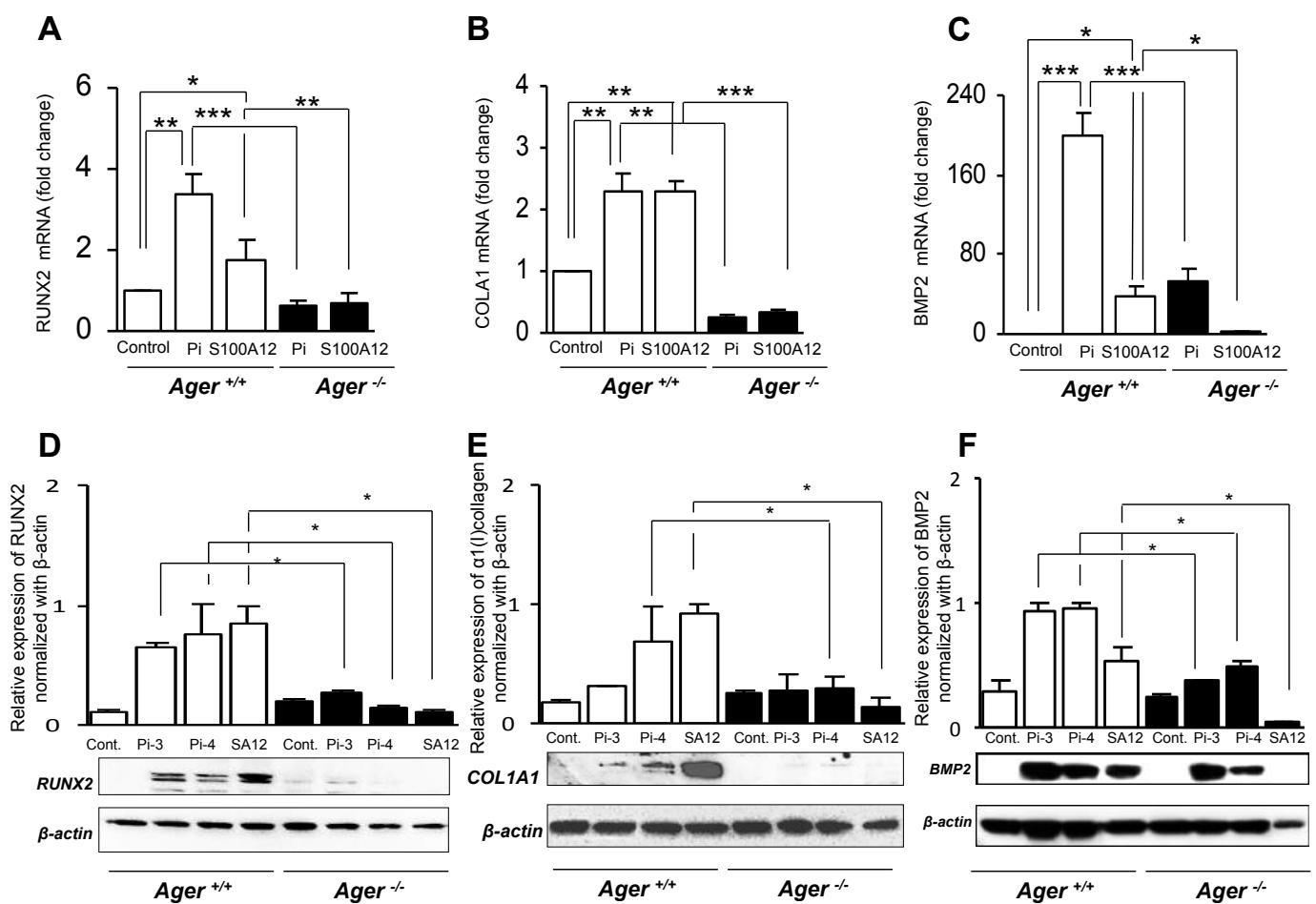


Figure 5

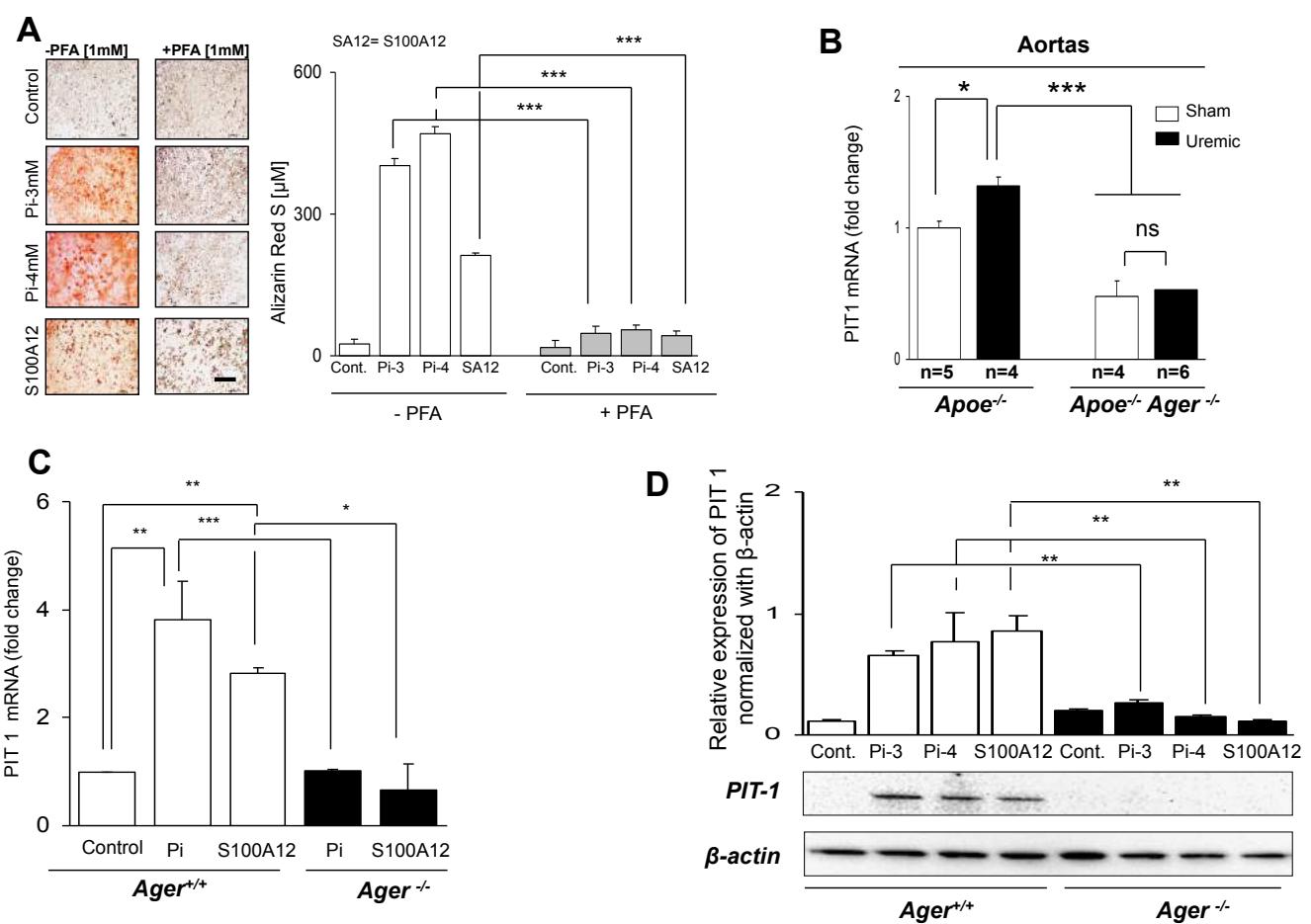


Figure 6

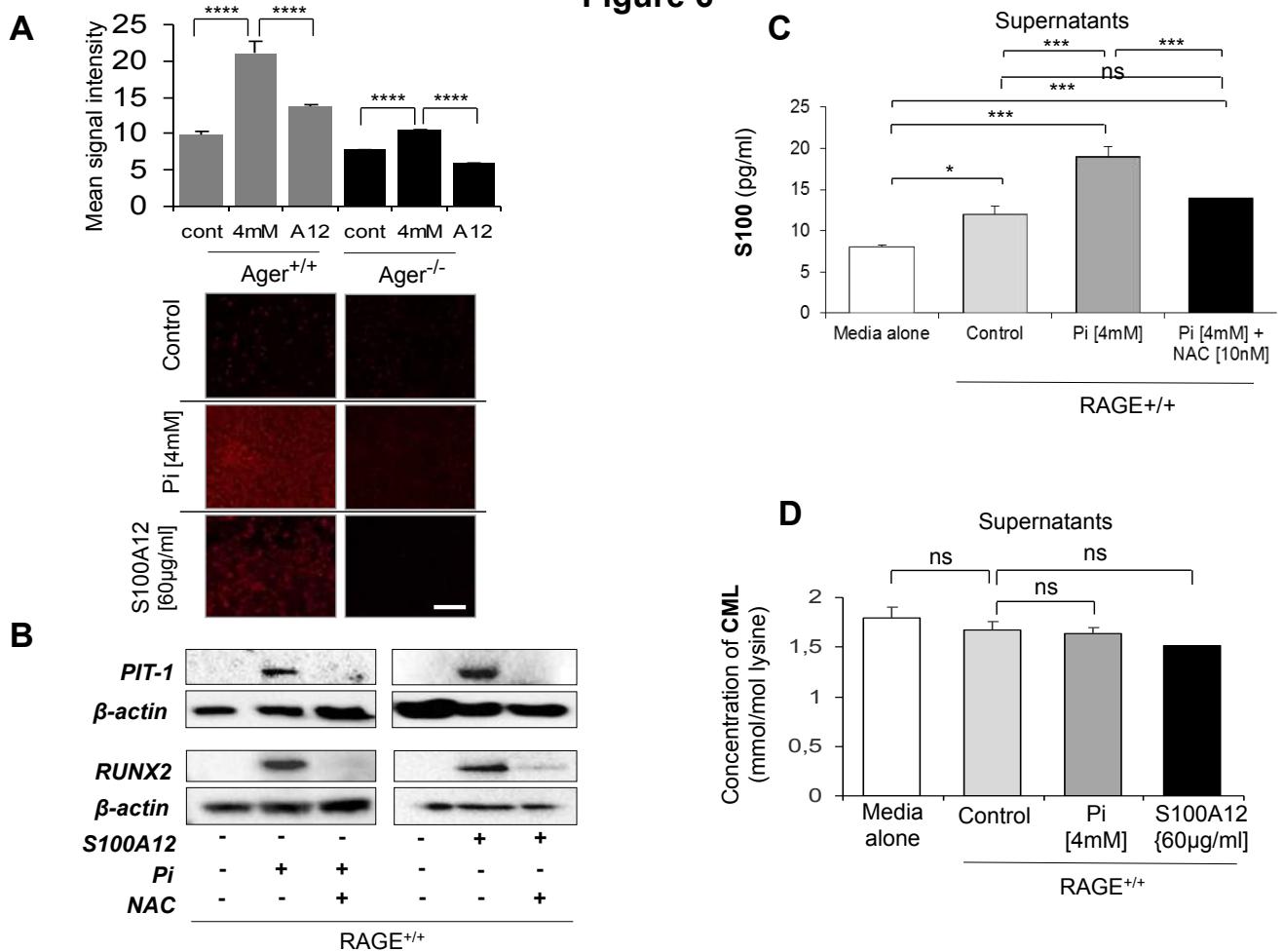
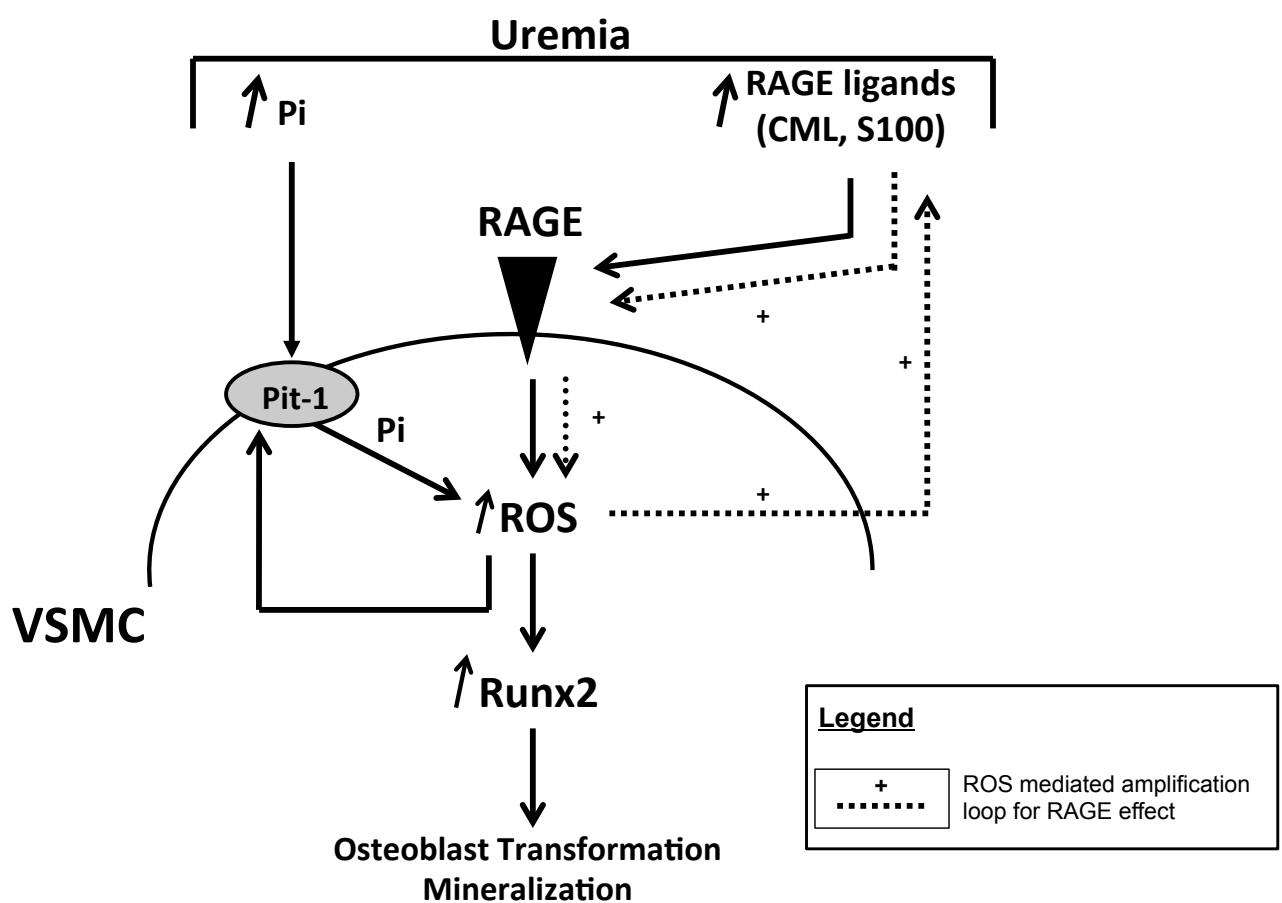


Figure 7



Article 3 :

Signaling through Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) is involved in Chronic Kidney Disease related arterial thrombosis.

Ortillon J, Hazard N, Belmokhtar K, Kawecki C, Terryn C, Schmidt A-M, Nguyen P, Rieu P, Maurice P, Touré F

La thrombose artérielle survient le plus souvent suite à la rupture ou l'érosion d'une plaque d'athérome qualifiée de plaque compliquée dite instable. Elle constitue une complication aigüe de l'athérosclérose responsable d'accidents fatals comme l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral. La thrombose est une complication fréquente chez les insuffisants rénaux, et les dommages liés à celle-ci sont les principales causes de mortalité chez ces patients. Un thrombus artériel est principalement composé de plaquettes agrégées au niveau de la paroi artérielle lésée, mais également entre elles. Certaines études ont retrouvé une hyperactivité plaquettaire qui pourrait jouer un rôle dans la formation de thrombus, au cours de l'IRC [138]. La modification de l'environnement plasmatique au cours de l'urémie influence considérablement la réponse plaquettaire.

L'accumulation de toxines urémiques est principalement responsable de cette dysfonction plaquettaire. Une étude récente a montré que l'indoxyl sulfate, connue pour être une toxine urémique, induit une hyperactivité plaquettaire *via* une forte production d'espèces réactives de l'oxygène [281]. Les produits de la glycation avancée (AGE) sont des protéines hétérogènes à longue durée de vie, qui s'accumulent chez les patients en IRC. Ils sont produits à partir d'une réaction chimique non-enzymatique. Plusieurs études ont montré que les AGEs sont capables d'induire une hyperactivité plaquettaire, au cours de certaines pathologies comme le diabète [258]. Mais le rôle des AGEs et de RAGE dans l'agrégation plaquettaire et la thrombose artérielle au cours de l'IRC n'est à ce jour pas connu.

Ainsi nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation sérique des ligands de RAGE et leurs interactions avec RAGE participait à la formation du thrombus artériel au cours de l'IRC.

Pour répondre à cette hypothèse et, dans ce troisième article (pages 151-186), nous avons dans la première partie de l'étude utilisé une approche *in vivo*, à l'aide d'un modèle murin de vasculopathie urémique dans le fond génétique C57/Bl6 ApoE^{-/-} et ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}. L'insuffisance rénale chronique a été induite par une néphrectomie au 5/6^{ème}, des animaux n'ayant pas subi de néphrectomies ont été utilisés comme contrôle. Après 12 semaines d'IRC, une thrombose est induite au niveau de la carotide de ces

souris à l'aide d'un patch de perchlorure de fer. Le temps de formation du thrombus est alors mesuré par imagerie intra vitale jusqu'à l'arrêt total du flux sanguin.

A l'aide de cette approche, nous avons observé que le temps d'occlusion totale de la carotide était significativement réduit chez les souris ApoE^{-/-} rendues urémiques comparé à des souris non urémiques. Ce résultat indique une accélération du processus thrombotique chez la souris urémique. Nous avons également observé que chez les souris invalidées pour RAGE il n'y avait pas d'accélération du processus thrombotique en condition urémique. . De plus, avant la formation du thrombus occlusif et stable, nous avons constaté un nombre significativement plus important d'emboles formés chez les souris ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} que chez les souris ApoE^{-/-}.

Ces résultats in vivo montrent que l'IRC induit une formation accélérée d'un thrombus artériel et que la délétion de RAGE protège de cette accélération. L'instabilité du thrombus entre les deux génotypes suggère que RAGE pourrait être un acteur important au cours de l'agrégation plaquettaire.

Dans la suite de l'étude, nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'IRC et de RAGE sur la fonction plaquettaire *ex-vivo*. Cette étude a permis de collaborer avec le laboratoire du Pr Philippe Nguyen qui possède l'expertise et les outils nécessaires à l'étude de la fonction plaquettaire.

Pour cela, nous avons dans une premier temps étudié la fonction plaquettaire en sang total à l'aide d'un Multiplate® Analyseur. Cette agrégométrie mesure l'agrégation par impédance, une méthode originale comparée aux autres techniques classiques d'agrégométrie par turbidimétrie. Parallèlement, nous avons étudié les marqueurs d'activation plaquettaire tels que l'activation de l'intégrine α IIB β 3 et l'exposition de la P-selectine par cytométrie en flux. Enfin, nous avons étudié l'agrégation en plasma riche en plaquettes.

Nous avons observé une augmentation significative de l'agrégation plaquettaire en sang total ainsi qu'en plasma riche en plaquettes chez les souris ApoE^{-/-} rendues urémiques comparée aux non urémiques, en réponse à un agoniste faible (ADP) et à des agonistes

fort (collagène et thrombine). Nous avons également montré que l'IRC induisait une augmentation significative de l'activation de l'intégrine α IIB β 3 ainsi que de l'exposition de la P-sélectine en réponse à la thrombine.

Chez les souris ApoE $^{-/-}$ /RAGE $^{-/-}$, l'IRC induit également une augmentation significative de l'agrégation plaquettaire en réponse aux différents agonistes en sang total. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'agrégation plaquettaire en plasma riche en plaquettes. En accord avec les résultats obtenus en plasma riche en plaquette, nous n'avons pas non plus, observé d'augmentation du niveau de l'expression des marqueurs d'activation plaquettaire (α IIB β 3 et P-sélectine) en condition urémique comparativement aux non urémiques.

Il a été intéressant de noter que les plaquettes issues des souris ApoE $^{-/-}$ /RAGE $^{-/-}$ urémiques avaient, en réponse à la thrombine, un niveau d'expression d' α IIB β 3 et P-sélectine plus faible que les plaquettes issues des souris ApoE $^{-/-}$ urémiques.

Ces résultats montrent que l'IRC induit une hyperactivité plaquettaire non retrouvée chez les souris ApoE $^{-/-}$ /RAGE $^{-/-}$. La signalisation de RAGE pourrait donc participer à cette hyperactivité induite par l'IRC.

Dans un second temps, nous avons voulu savoir si la fonction plaquettaire était modifiée lorsque les plaquettes étaient lavées de leur environnement plasmatique urémique ou non urémique. Le but de cette expérience est de comprendre si, intrinsèquement, la plaquette est modifiée ou non au cours de l'IRC ou par la présence de RAGE.

Pour cela nous avons effectué des tests d'agrégations et étudié les marqueurs d'activation plaquettaire au niveau de plaquettes lavées, issues de souris ApoE $^{-/-}$ et ApoE $^{-/-}$ /RAGE $^{-/-}$ urémiques ou non urémiques, en réponse à différentes concentration en thrombine.

Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de différence d'agrégation plaquettaire ni de différence dans le niveau d'expression des marqueurs d'activation entre les souris ApoE $^{-/-}$ urémiques et non urémiques. Nous observons également des résultats similaires lorsque les souris sont déletées pour RAGE. De plus nous avons constaté aucune différence entre les deux génotypes lors de ces expériences.

Ces résultats suggèrent que l'état IRC et que la délétion de RAGE n'induisent pas de modification intrinsèques de la fonction plaquettaire

Dans un troisième temps, nous avons voulu répondre à l'hypothèse que l'augmentation des toxines urémiques dans l'environnement plasmatique, telles que les AGEs ou le S100A12 pouvaient conditionner l'activité plaquettaire en réponse à la thrombine de façon RAGE dépendante.

Pour cela, nous avons pré-incubé avec de la HSA-glyquée ou non, ou du S100A12, des plaquettes lavées issues de souris ApoE^{-/-} ou ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}. Puis nous avons effectué un test d'agrégation en réponse à la thrombine.

Nous avons observé une augmentation significative de l'agrégation plaquettaires lorsque les plaquettes issues de souris ApoE^{-/-} ont été pré-incubées avec de la BSA-glyquée ou du S100A12 comparé aux plaquettes contrôles pré incubées avec de la BSA contrôle ou du PBS. De plus, la pré-incubation de plaquettes issues de souris ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} avec de la BSA-AGE ou du S100A12 n'entraînait pas d'amplification de la réponse agrégative.

Ces résultats montrent que les toxines urémiques telles que les AGEs et les ligands de RAGE peuvent conditionner l'activité plaquettaire en réponse à un agoniste de manière RAGE dépendante.

L'ensemble de ce travail a permis de montrer, pour la première fois, que RAGE semble participer à la thrombose artérielle dans un modèle murin d'insuffisance rénale chronique. Ce travail constitue la preuve de concept que l'accumulation des AGEs et des ligands de RAGE au cours de l'IRC, et leur interaction avec RAGE peut conditionner la réponse plaquettaire et ainsi participer à la thrombose artérielle au cours de l'IRC.

Signaling through Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) is involved in Chronic Kidney Disease related arterial thrombosis

Jérémie ORTILLON, Nathalie HEZARD, Karim BELMOKHTAR, Charlotte KAZECKI,

Christine TERRYN, Ann Marie SCHMIDT, Philippe RIEU, Philippe NGUYEN,

Pascal MAURICE and Fatouma TOURÉ

- 1- CNRS UMR 7369 (Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, MEDyC), Reims.
- 2- EA3801, Hémostase et remodelage vasculaire post-ischémique (HERVI), Faculté de Médecine, Reims, France; CHU Reims, Hôpital Robert Debré, Laboratoire d'Hématologie,
- 3- Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Faculté de Médecine, Reims.
- 4- Service de Néphrologie, Centre Hospitalier Universitaire, Reims
- 5- NYU Medical center, New York

Running Title: RAGE, CKD, arterial thrombosis

Address correspondence to: Fatouma Touré, MD, PhD

Division of Nephrology & URCA CNRS UMR 7369
Hôpital Maison Blanche,
45 rue Cognacq-Jay
51100 Reims - France.
Fax: +33 3 26 78 37 76
Phone: +33 3 26 78 76 38
E-mail: ftoure@chu-reims.fr

Abstract

Introduction Chronic kidney disease (CKD) is associated with extensive vascular wall remodelling and vasculopathy as well as accumulation of uremic toxins. Among these toxins, advanced glycation end-products (AGEs) interact with the receptor for advanced glycation end-products (RAGE). In this study, we aimed to analyze the impact of CKD on arterial thrombosis and the potential role of RAGE in this process. **Methods** We used a mouse model of uremic vasculopathy consisting in a 2-step 5/6 nephrectomy. Four groups of animals were studied: ApoE^{-/-} mice sham operated or uremic and ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} mice sham operated or uremic. Twelve weeks after surgery: 1) arterial thrombosis was induced by ferric chloride application on the carotid artery and complete carotid occlusion time was measured, 2) platelet function was analysed in whole blood and in platelet rich plasma (PRP). **Results:** *In-vivo*, uremia significantly accelerates the occlusion time in *ApoE^{-/-} mice* (9.18 ± 1.1 min vs 11.10 ± 0.6 min, $p < 0.01$) compared to sham animals. In contrast, uremia had no effect on *ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}* mice carotid occlusion time (14.5 ± 2.34 min, vs 13.0 ± 1.5 min in sham, NS). Moreover occlusion time of the uremic *ApoE^{-/-}* mice was significantly accelerated compared to uremic *ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}* mice ($p < 0.0001$). **Ex-vivo**, agonist-induced platelet aggregation in whole blood was significantly increased in uremic condition in both *ApoE^{-/-}* and *ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}* mice. In PRP, aggregation of uremic *ApoE^{-/-}* mice platelets was significantly increased compared to that of uremic *ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}* mice. In agreement, agonist induced expression of activated integrin $\alpha IIb\beta 3$ and P-selectin were both significantly increased at the surface of *ApoE^{-/-}* uremic platelets compared to 1) *ApoE^{-/-}* sham platelets and to 2) *ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}* platelets (uremic & sham). **Conclusion/Discussion:** In this murine

model of thrombosis we report that uremia accelerates arterial thrombus formation and induces platelets hyperactivity. We found that RAGE deletion had a protective role on uremia-induced arterial thrombosis, and in uremia-induced platelet hyperactivity. We suggest that RAGE signaling may be involved in CKD-induced atherothrombosis.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is associated with an increased risk of cardiovascular events centered by pathological arterial thrombosis, including myocardial infarction and stroke [1]. Factors underlying this risk include accelerated atherosclerosis, endothelial dysfunction, and platelet hyperactivity. However the mechanisms linking CKD to arterial thrombosis formation are not well understood [2], [3].

The uremic environment itself is harmful and uremic toxins have emerged as a key factor in CKD related cardiovascular disease [4]. These uremic toxins are classified in three groups by their behavior during dialysis [5]: the small water-soluble molecules, the middle molecules, and the protein-bound molecules, which are hardly removed by conventional hemodialysis treatments. Among the uremic toxins, long-lived heterogeneous protein adducts, produced from nonenzymatic chemical reaction between sugars and the amino groups of proteins (Maillard reaction) named advanced glycation end products (AGE) [6].

Those AGEs are of particular interest because they have an established cardiovascular toxicity and because they are ligands for the receptor for advanced glycation end products (RAGE). RAGE is a cell surface receptor of the immunoglobulin superfamily involved in different processes, such as cell migration, adhesion, and proliferation [7]–[10]. Other ligands of RAGE are also increased in CKD condition like proteins from the S100 family, Serum Amyloid A (SAA) and High mobility group box1 (HMGB1). RAGE ligands can trigger a pro-inflammatory response and endothelial dysfunction via RAGE engagement [8], [11], [12]. RAGE signaling has also been involved in uremia-induced

atherosclerosis and in atherosclerotic plaque frailty. Those later events are linked to plaque rupture and thrombus formation via metalloproteinase secretion. [13]–[18]

The role of RAGE axis in thrombus formation is unclear, few studies have shown that RAGE is expressed on platelet and that AGEs and RAGE ligands such as amyloid- β fibrils when used with platelet agonists, are able to induce an increased platelet aggregation.

We previously showed that RAGE was a key player in CKD related atherosclerosis and vascular calcification. In the present study, we used *in vivo* and *ex vivo* approaches to investigate the role of RAGE in arterial thrombosis formation with a focus on CKD-mediated modulation of platelet functions.

Results

Uremia accelerates arterial thrombosis *in vivo* and RAGE deletion protects from this acceleration

We used a previously described well-established uremic mouse model to study the role of RAGE in thrombosis [15]. We subjected ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} mice to a sham operation (Sham) or surgically-induced CKD (CKD). Twelve weeks after surgery, we controlled the biological variables of the mice. The induction of CKD in two genotypes was associated with a significant increase in urea, creatinine, and cholesterol levels in both genotypes. Triglycerides, calcium and phosphorus were unmodified. As expected red blood cells, hemoglobin and hematocrit were significantly lower in uremic group compared to sham operated group (Table 1).

We investigated the role of uremia and RAGE in *in vivo* thrombosis using the FeCl₃-induced carotid thrombosis model. The development of the thrombus, and the following complete vessel occlusion was monitored under a microscope in real time. We compared the time for the formation of stable occlusive thrombus of each group. The thrombus formation time was significantly accelerated in CKD ApoE^{-/-} mice compared with Sham ApoE^{-/-} mice (9.2 ± 1.1 minutes versus 11.1 ± 1.2 minutes, respectively; $p=0.006$; Figure 1A and 1B). To examine whether RAGE was implicated in arterial thrombus formation *in vivo*, the same experiments were made in ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} mice. Compared ApoE^{-/-} mice arterial thrombus formation was delayed in Sham ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} mice (Figure 1A and 1B). Furthermore induction of CKD in ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} mice did not modify the time to complete occlusion of the artery. Interestingly the mean arterial

occlusion time of uremic ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} mice was longer than that of uremic ApoE^{-/-} mice (14.55 ± 3.2 minutes versus 9.2 ± 1.1 minutes $P<0.0001$). In addition, we analyzed, the percentage of embolic thrombus occurring before the complete occlusion of the artery. This percentage was 6.5 times higher in CKD ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} compared to ApoE^{-/-} mice (54.5% vs 8.3%; Figure 1C). These observations strongly suggest that uremia promotes arterial thrombus formation and that RAGE signaling is involved in this phenomenon.

Platelets cell-surface receptors expression

To analyze if the differences we found in the arterial thrombus formation time were related to differences in the cell surface receptors expression, we performed flow cytometry analysis of cell expression of $\alpha 2$, GPIb α , GPIb β , CD36 (GPIV), GPVI $\alpha IIb\beta 3$ and RAGE. We observed the same count of platelet in each groups with the same mean platelet volume (Table 2). By Western blotting we found that RAGE was expressed in platelets isolated from ApoE-/- animals whereas it was not found in ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} animals. (Figure 2A and 2B). Moreover flow cytometry analysis showed that cell surface expression of all of our receptors of interest were equal in both genotype and that CKD condition did not induced modifications of the expression of these receptors. Therefore we concluded that the observed differences in the carotid artery occlusion time were not the result of differences in platelets surface receptors expression.

Uremic condition induces platelet hyper-reactivity

We analyzed the effect of CKD on platelets activation reflected by $\alpha IIb\beta 3$ activation (using a mAb (JON/A) specific for the activated conformation of the mouse integrin) and P-selectin surface expression using flow cytometry. At a resting state and compared to sham ApoE^{-/-}, CKD had not effect on the activation level of $\alpha IIb\beta 3$ and P-selectin. But in response to small amount of thrombin, $\alpha IIb\beta 3$ expression was significantly increased, in platelets isolated from CKD ApoE^{-/-} mice compared to Sham operated ApoE^{-/-} mice (3.1 ± 0.55 MFI vs 1.9 ± 0.54 MFI ($p < 0.05$)). Similarly, stimulation with thrombin (10 mU/mL) induced higher expression of P-selectin in platelets of CKD ApoE^{-/-} mice than in that of Sham operated animals (7.0 ± 1.4 MFI vs 3.4 ± 0.7 MFI ($P < 0.05$)) (Figure 3B).

Then the effect of CKD was investigated on platelet aggregation. First in whole blood by impedance aggregometry with a multiplate analyzer (Roche). We found that compared to platelets isolated from sham animals, CKD condition significantly increased platelets aggregation in response to a weak agonists such as ADP or a to a stronger platelet agonists such as collagen: a to 2.6 fold increase in aggregation was found ($p<0.01$ compared to platelets isolated from sham operated group) for ADP and 1.7 fold increase for collagen ($p<0.01$ compared to platelets isolated from sham operated group) higher respectively (Figure 3A).

We next evaluated the effect of CKD on plasma rich platelets aggregation by turbidimetry aggregometer Soderel. As shown in Figure 3C, CKD significantly increased platelet aggregation induced by thrombin. In response to a low concentration of thrombin (50mU/mL), the percentage of aggregation max was $41\pm7,1\%$ for CKD group vs $21\pm6,3\%$ for sham ApoE^{-/-} group $p<0,05$, but for both groups aggregation was not sustained and was reversible (figure 3C). On the contrary for higher thrombin concentration (100mU/mL), aggregation was more stable and sustained, furthermore CKD group had a higher amplitude of aggregation than sham group $82\pm3,4$ vs $62\pm6,2\%$ of max aggregation in sham operated group; $p<0,01$;

Taken together, these data indicate that in ApoE^{-/-} mice CKD condition as an impact in platelet functions and increases both platelet aggregation and activation. Therefore CKD condition induces platelets hyper-reactivity.

RAGE deletion limits uremia induced platelets hyper-reactivity

Our results in the carotid artery model suggest that RAGE deletion prevents in vivo CKD induced arterial thrombosis. We therefore examined the link between RAGE signaling and platelet reactivity.

We investigated the platelet aggregation and cell-surface activation markers in ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} platelets in whole blood in CKD or Sham conditions. We found that, in ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} mice and in response to the stimulation by thrombin, α IIb β 3 activation and P-selectin surface exposure were not significantly increased in the CKD condition compared to Sham operated group (Figure 4B). We then analyzed platelet aggregation. In whole blood analysis, we found that compared to sham operated group, CKD condition significantly increases platelet aggregation in response to ADP and collagen. Areas under curve where: 575±80 AU*min for CKD vs 97±46 AU*min for Sham operated in response to ADP; p<0,01 and 571±61 vs 241±72 AU*min; p<0,01 in response to collagen (Figure 5A).

We then evaluated the effect of RAGE deletion on plasma rich platelets aggregation. We found that compared to Sham operated group, CKD condition did not increase ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} platelet aggregation in response to thrombin at 50mU/mL (Figure 4C). At a higher concentration of thrombin (100mU/mL), CKD condition increases platelet aggregation compared to Sham operated group (70±1.5 vs 50±4.5% of max aggregation; p<0.01;). Interestingly we found that in some cases spontaneous de-aggregation (aggregation reversion) after 5 min of observation. This occurred 62.5% of cases in the ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} Sham operated group.

We then compared the results obtained for the ApoE^{-/-} group to those obtained in the ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} group. We found that thrombin induced α IIb β 3 activation and P-selectin expression in CKD ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} group were significantly lower compared to those of CKD ApoE^{-/-} group (80% p<0.05 for α IIb β 3 activation and 55% for P-selectin p=0.05 lower respectively) (Figure 3B & 4B). Whole blood aggregation features were not different between CKD ApoE^{-/-} and CKD ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} groups.

However, PRP aggregation in response to 50 and 100 mU/mL of thrombin was lower in Sham ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} group compared to ApoE^{-/-} group at 50 mU/ml: 70±1.5 vs 82±3.4 % of max aggregation p<0.01; respectively (Figure 3C & 4C).

These observations suggest that RAGE deletion lowers CKD effects on platelets functions; therefore suggesting that RAGE signaling participates in CKD induced platelet hyperactivity.

Effect of CKD and RAGE deletion on washed platelets function

To further investigate whether CKD condition and RAGE signaling modify platelets intrinsically, we examined platelets function of washed platelets isolated from their plasma environment. As shown in figure 5A, washed platelets of each group of mice were analyzed for activation and aggregation. Platelets did react similarly to agonist stimulation. In response to increasing thrombin concentration (25, 50, 100 mU/mL) we did not find any difference on platelet aggregation or activation level of α IIb β 3 and P-selectin, between CKD ApoE^{-/-} group and Sham ApoE^{-/-} group washed platelets,. Similarly, no difference was seen between CKD and Sham ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} washed platelets (Figure 5A and Figure 5B).

Moreover, no significant difference was observed in platelets aggregation and cell-surface expression markers between ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} groups.

Taken together, these data indicate that isolating platelets from CKD environment abolishes the CKD induced activation and the RAGE effect suggesting that the modifications we found did not result from intrinsic modifications of the platelets.

RAGE ligands accumulates in uremic environment and are involved in platelet hyper-reactivity

Because our results suggested that uremic milieu was an important component of CKD-mediated platelet hyperactivity, we analyzed the components of the sera that could be responsible of this phenotype. Uremia is associated with the retention of various solutes that are normally excreted by the kidneys and that are also potential binding partners for RAGE such as AGEs or s100 proteins. We measured the concentration of AGE: carboxymethyllysine (CML) in the serum of each group. We found that CML concentration was significantly higher in the serum of CKD ApoE^{-/-} mice than in that of Sham ApoE^{-/-} mice (0.26 ± 0.02 vs 0.2 ± 0.01 respectively; $p < 0.01$) (Figure 6A). In contrast, the concentration of CML in CKD ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} sera tends to be higher compared to Sham ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} sera, but the difference did not reach statistical significance (0.21 ± 0.02 vs 0.18 ± 0.01 respectively; $p = 0.06$). No difference was observed between both sham groups.

Then, to further analyze the role of these RAGE ligands in the modulation of platelets functions, we tested the ex-vivo stimulation of ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} platelets with

AGE-BSA or S100A12. Incubation of isolated and washed platelets with AGE-BSA alone or with S100A12 alone did not induce platelet activation or aggregation.

Therefore we pre-incubated the platelets with AGE-BSA (100 μ g/mL) for 10 minutes prior to stimulation with thrombin (25mU/mL). In these conditions we found a 2.5 fold increase in aggregation of ApoE^{-/-} washed platelets following pre-incubation with AGE-BSA compared to pre-incubation with control-BSA ($p = 0.028$) (Figure 6B). We also tested another RAGE ligands, S100A12. Increasing doses of S100A12 were used for pre-incubation leading to a dose effect on platelets aggregation in response to thrombin (Figure 6C). At a concentration of 60 μ g/mL of S100A12 and compared to control, a 1.7 fold increase was found. In ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} washed platelet, pre-incubation with glycated-BSA or S100A12 did not enhance thrombin-induced platelet aggregation, therefore suggesting that AGE-BAS and s100A12 effect was mediated by a specific interaction with their receptor RAGE.

All these data demonstrate that RAGE ligands accumulation and RAGE engagement during CKD is involved in arterial thrombus formation at least in part through RAGE mediated increased platelet reactivity.

DISCUSSION

The risk of cardiovascular events increases steadily with declining glomerular filtration rate. Individuals with chronic kidney disease (CKD) have a 10- to 20-fold higher risk of death due to cardiovascular complications than the general population [19], [20]. Vascular disease in these patients is considered as a pathologic condition characterized by accelerated vascular ageing, including arteriosclerotic lesions (vascular calcifications affecting the medial layer of vessels) and extensive atherosclerosis [19], [21]. This vascular disease predisposes to thrombotic events. The underlying mechanisms are not fully identified and constitute a critical barrier to the therapeutic approach in CKD patients. However, a participative role of the uremic milieu has been suggested. Indeed, CKD is also characterized by the retention of various solutes that are normally excreted by the kidneys. Those solutes can exert biological effects. Among them AGEs result from the binding of reducing sugars or their by-products to proteins to form an Amadori product, further exposed to irreversible oxidative processes leading to the generation of advanced glycation end products (AGEs). Accumulation of AGEs is increased in CKD condition therefore favoring interaction with the pro-inflammatory receptor RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), a ubiquitous multi-ligand receptor [8].

Recently, we and others have reported that RAGE was involved in specific CKD-related vascular changes such as uremic atherosclerosis and uremic vascular calcifications [14], [15]. These findings suggest that CKD-induced accumulation of AGEs and other RAGE ligands may induce increased activation of RAGE leading to vascular remodeling.

Here we investigated the impact of CKD condition in arterial thrombus formation and the role of the receptor for advanced glycation end products in this phenomenon.

We used a well-characterized mouse model of CKD vasculopathy and the carotid artery thrombosis model. We found that the induction of uremia in ApoE^{-/-} mice accelerated arterial thrombosis formation *in vivo*, by reducing the occlusion time. To our knowledge this is the first report of CKD prothrombotic effect in a mouse model of carotid artery thrombosis. However, the propensity of the uremic milieu to induce thrombosis was previously reported for CKD patients. For instance, in the context of coronary intervention, the one year mortality related to stent thrombosis is increased in CKD patients (15.2%) and in dialyzed patients (10.0%) compared to non CKD patients (1.9%). Our results are in agreement with these reports. Furthermore, a potential explanation was reported by Chitalia et al [22]. Using primary cultures of human vascular smooth muscle cells they report an increased secretion of tissue factor during incubation of these cells with uremic serum and uremic toxins such as indole-3-acetic acid. Uremic toxins were able to prolong tissue factor half-life by inhibiting its ubiquitination. These reports argue for a prothrombotic state associated with the CKD condition.

More recently, Holy et al reported a similar prothrombotic state induced by another uremic by-product, carbamylated low density lipoproteins. Using a murine carotid photochemical injury model and intravenous administration of carbamylated LDL (cLDL), they report an accelerated arterial thrombus formation partly mediated by cLDL induced expression of tissue factor in vascular wall and increased platelet aggregation *in vitro* [23].

In the present study, we do confirm the procoagulant state induced by CKD condition. Furthermore we found that platelets may also participate to this prothrombotic

phenotype. Previous reports lead to conflicting findings concerning the modulation of platelets function with CKD: on one hand abnormalities of the primary hemostasis were reported including platelet dysfunction and impaired platelet-vessel wall interactions. On the other hand, several studies have shown that platelet reactivity is increased in CKD patients undergoing dialysis.

These discrepancies are partly related to the methodology used. More recent data argue for a direct effect of uremic milieu on platelets activation. Plé et al, analyzed the transcriptome of uremic platelets and found some impairments that could be corrected by initiation of dialysis [24]. In addition, Jain et al, measured whole blood aggregation of platelets and found an increased response to ADP of CKD platelets compared to matched controls. They also reported an increased residual platelet aggregation after initiation of clopidrogel treatment in CKD patients compared to control patients [25]. Therefore more recent data with new technologies argue for a central role of platelets in CKD prothrombotic phenotype.

Our results are in agreement with these findings. Furthermore a report a new role for RAGE in the modulation of platelets functions during CKD. Here we combined the study of the platelet activation markers and platelet aggregation and, we found that uremia induced platelet hyperactivity in responses to different agonists. We used whole blood aggregation and plasma rich platelets aggregation. Both methods found increased aggregation of platelets in the CKD condition. This hyperactivity was associated with increased α IIb β 3 activation and P-selectin exposure. Interestingly, we found that RAGE deletion inhibited CKD effects when low doses of agonists were used. However at higher dose of thrombin, we observed a loss of this protective effect. Furthermore we found that

aggregation was less stable when RAGE was deleted. This suggests that RAGE signaling modulates platelet sensibility in presence of small doses of agonists but in presence of higher doses this mechanism is overrun.

We then analyzed washed platelets from uremic or non-uremic mice from both genotypes. We found that when platelets are isolated of their plasma environment they do respond identically to an increasing concentration of thrombin. This suggests that platelets are not intrinsically modified by Uremia or by RAGE deletion and therefore suggest that supposed that the uremic environment "primes" the platelet response.

Then we found that preincubating platelets isolated from ApoE^{-/-} mice with RAGE ligands AGEs (Glycated-BSA) or S100 proteins induced an increased platelet aggregation in response to low dose of thrombin. These data are consistent with earlier studies showing that platelet aggregation in response to the weak agonists serotonin or ADP was also increased in response to AGEs [26]–[29]. Our data also show that the enhancing effect of RAGE ligands on platelet activation was RAGE dependent.

In summary, this study describes a novel mechanism by which uremia mediated accumulation of RAGE ligands increases platelet hyperreactivity to low concentration of agonists in a RAGE dependent manner. This could create a prothrombotic state in which circulating CKD platelets are "primed" to injury and thus promote enhanced thrombus formation. Urther studies are needed to analyze the role of vascular wall modifications during CKD in this prothrombotic state. However, we believe that our results constitute a strong basis for designing preclinical studies aiming to target RAGE ligand-RAGE axis and that these approaches could be novel and beneficial to prevent thrombotic

complications in CKD patients.

Methods

Reagents and antibodies

Horm collagen was purchased from Nycomed. ADP was obtained Multiplate reagents from Roche Diagnostics. Rhodamine 6G, apyrase, prostaglandin E1 (PGE1), ferric chloride and Thrombin were from Sigma. D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone dihydrochloride (PPACK) was from Calbiochem. The PE-coupled mouse JON/A, anti-GPIb α , anti-CD62P antibodies and FITC-coupled α 2, anit-GPIb β anti-GPVI, antibodies were from Emfret Analytics. PE-CD36 and FITC-CD41 were from BD Biosciences. Rat monoclonal anti-RAGE antibody was from R&D systems. HRP-coupled anti-rat IgG was from GE Healthcare. Glycated-HSA and No glycated-HSA used as the AGE in this study, was made as previously described [30].

Animals

Apolipoprotein E knockout ($\text{ApoE}^{-/-}$) mice on a C57BL/6 background were purchased from Charles River Laboratories®. $\text{ApoE}^{-/-}$ /RAGE $^{-/-}$ mice were generated using a backcross-intercross scheme in the animal facility of New York University (Dr Schmidt). Embryos from the F3 generation were rederived and mice arising from the rederivation process transferred to the animal facility of Reims France (IFR53 Pôle Santé, Reims, France). Animals were housed in a barrier- and pathogen-free animal facility with a 12 h light-dark cycle and fed a regular chow diet. All experiments were approved by the ethics committee for animal care and use of Reims Champagne Ardenne (CEEA-RCA-56). The number of mice per experiment is indicated in the figure legends.

Induction of uremia

Twelve-week old ApoE^{-/-} or ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} mice were randomly assigned to CKD or sham-operated groups (Sham). A two-step surgical procedure was used to induce CKD. Surgery was performed under isofluran (Axience). The two poles of the left kidney were excised, and one week later the right kidney was removed, resulting in a 75% reduction in total renal mass. Control animals underwent sham operations involving the decapsulation of both kidneys. All mice were sacrificed at 12 weeks after surgery.

Biochemical and haematological analysis

Serum concentration of urea, total cholesterol, triglycerides, calcium and phosphorus were measured by automated assays using a Modular® analyzer (Roche Diagnostics). Complete blood counts, hematocrit and hemoglobin were determined with a hematolgy cell counter ADVIA 2120 (Siemens).

Carotid artery thrombosis model

Mice were anesthetized with 25% urethane. Rodamine 6G was used to label endogenous platelets and leuckocytes. The carotid was isolated from surrounding tissue by black plastique sheet. Vascular injury was performed by applying a filter paper (2x1mm, 1mm thickness) saturated with 7.5% FeCl₃ onto the carotid for 1 minutes. After removing the filter paper, thrombus formation was monitored in real time with the epifluorescent microscope (Nikon Eclipse E400) connected to the digital camera. The time to complete occlusion was defined as blood flow being stopped for at least 1 minute.

Whole blood platelet aggregation

Mice were anesthetized with 25% urethane (Sigma). Whole blood was collected from the inferior vena cava in 0.129M sodium citrate 1/6 v/v. Whole blood aggregation was monitored by impedance aggregometry at 37°C with stirring using the Multiplate® analyzer. Whole blood was diluted in physiological saline (1:1) and adding Horm collagen (2.5 µg/mL), ADP (5 µM). Curves were recorded for 6 minutes and platelet aggregation was determined as area under the curve (AUC) of arbitrary units (AU*min).

PRP platelet aggregation

Blood was collected with same method that whole blood aggregation, 700µL of whole blood was added in 500 µL of Ca²⁺-free modified Tyrode buffer. Diluted platelet-rich plasma (PRP) was separated by centrifuging at 100g for 10 minutes at 22°C. Diluted platelet-poor plasma (PPP) was prepared by further centrifugation at 800g for 2 minutes. Platelets were counted using a hematology cell counter and concentrations adjusted to 2.10⁸/mL with Ca²⁺-free Tyrode buffer immediately before platelet aggregation studies. Platelet aggregation was monitored by measuring light transmission through the stirred suspension of PRP at 37°C with a Soderel aggregometer in response to Thrombin.

Washed platelet aggregation

Whole blood was collected from the inferior vena cava and mixed with 80µM PPACK and 10% (vol/vol) ACD-C buffer (124mM sodium citrate, 130mM citric acid, 110mM dextrose, pH 6.5) to prevent coagulation. Platelet-rich plasma was obtained by centrifuging whole blood for 7 minutes at 160g. Platelets were obtained from platelet-rich

plasma by centrifugation for 10 minutes at 670g and washed in the presence of apyrase (100 mU/mL) and prostaglandin E1 (1 μ M) to minimize platelet activation. The numbers platelets were adjusted to 2.10^8 /mL in modified Tyrode-HEPES buffer (137mM NaCl, 2mM KCl, 0.3mM NaH₂PO₄, 5.5mM glucose, 5mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 12mM NaHCO₃, 2mM CaCl₂, pH 7.3. Platelet aggregation was measured with a Soderel aggregometer in response to Thrombin. For testing

Flow cytometry

Diluted whole blood or washed platelets (2.10^6 /mL) were stimulated with a range of agonists, as indicated. After incubation for 5 minutes at room temperature without stirring, platelet were incubated with appropriate fluorophore-conjugated antibodies for 10 minutes at room temperature. The reaction was stopped by adding 500 μ L of PBS, and immediately analysed with a FC500 flow cytometer (Coulter). Platelet population was gated using their forward and side scatter characteristics. Acquisition and processing data from 10,000 platelets were performed and analysed using CXP software (Coulter). Mean Fluorescent Intensity (MFI) of the whole platelet population was used.

Immunoblotting

For the detection of RAGE, mouse washed platelets were lysed in ice-cold lysis buffer (Cell Signaling Technology) containing protease inhibitors and heating. Proteins concentration was determined by Bio-Rad protein assay (BioRad laboratories) and 10 μ g of proteins were subject to SDS-PAGE. Proteins were then transferred on a

nitrocellulose membrane. After saturation, membranes were incubated with anti-RAGE (1/2000) overnight at 4°C. Immunoreactive bands were revealed using a HRP-conjugated anti-Rat IgG secondary antibody (1/10000) followed by enhanced chemiluminescence detection reagents (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Results are expressed as mean +/- SEM. Two groups were compared using 2-tailed Mann-Whiney test. *P* values of less than 0,05 were considered as statistically significant.

- [1] R. Vanholder *et al.*, "Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality," *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.*, vol. 20, no. 6, pp. 1048–1056, Jun. 2005.
- [2] A. S. Go, G. M. Chertow, D. Fan, C. E. McCulloch, and C. Hsu, "Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization," *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, no. 13, pp. 1296–1305, 23 2004.
- [3] M. J. Landray *et al.*, "Inflammation, endothelial dysfunction, and platelet activation in patients with chronic kidney disease: the chronic renal impairment in Birmingham (CRIB) study," *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.*, vol. 43, no. 2, pp. 244–253, Feb. 2004.
- [4] N. Jourde-Chiche, L. Dou, C. Cerini, F. Dignat-George, and P. Brunet, "Vascular Incompetence in Dialysis Patients—Protein-Bound Uremic Toxins and Endothelial Dysfunction," *Semin. Dial.*, vol. 24, no. 3, pp. 327–337, May 2011.
- [5] R. Vanholder *et al.*, "Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability," *Kidney Int.*, vol. 63, no. 5, pp. 1934–1943, May 2003.
- [6] L.-C. Maillard, "Action des acides aminés sur les sucres ; formation des mélanoïdes par voie méthodique.,," vol. 154, pp. 66–8, 1912.
- [7] M. Koch *et al.*, "Structural Basis for Ligand Recognition and Activation of RAGE," *Structure*, vol. 18, no. 10, pp. 1342–1352, Oct. 2010.
- [8] A. M. Schmidt, S. D. Yan, S. F. Yan, and D. M. Stern, "The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses," *J. Clin. Invest.*, vol. 108, no. 7, pp. 949–955, Oct. 2001.
- [9] A. Goury *et al.*, "Deletion of receptor for advanced glycation end products exacerbates lymphoproliferative syndrome and lupus nephritis in B6-MRL Fas lpr/lpr mice," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 194, no. 8, pp. 3612–3622, Apr. 2015.
- [10] V. Rai *et al.*, "Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling," *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 13, pp. 2339–2350, Dec. 2012.
- [11] B. Xu, R. Chibber, D. Ruggiero, E. Kohner, J. Ritter, and A. Ferro, "Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products," *FASEB J.*, vol. 17, no. 10, pp. 1289–1291, Jul. 2003.
- [12] A. M. Schmidt *et al.*, "Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes.,," *J. Clin. Invest.*, vol. 96, no. 3, pp. 1395–1403, Sep. 1995.

- [13] E. Harja *et al.*, “Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE-/ mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 1, pp. 183–194, Jan. 2008.
- [14] S. Bro *et al.*, “A neutralizing antibody against receptor for advanced glycation end products (RAGE) reduces atherosclerosis in uremic mice,” *Atherosclerosis*, vol. 201, no. 2, pp. 274–280, Dec. 2008.
- [15] K. Belmokhtar *et al.*, “Signaling of Serum Amyloid A Through Receptor for Advanced Glycation End Products as a Possible Mechanism for Uremia-Related Atherosclerosis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 36, no. 5, pp. 800–809, May 2016.
- [16] X. Jin *et al.*, “Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF-K;B Pathway,” *BioMed Research International*, 2015.
- [17] M. Peled and E. A. Fisher, “Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression,” *Front. Immunol.*, vol. 5, Nov. 2014.
- [18] T. Ishibashi *et al.*, “Advanced glycation end product-mediated matrix metalloproteinase-9 and apoptosis via renin-angiotensin system in type 2 diabetes,” *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 17, no. 6, pp. 578–589, Jun. 2010.
- [19] T. B. Drüeke and Z. A. Massy, “Atherosclerosis in CKD: differences from the general population,” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 6, no. 12, pp. 723–735, Dec. 2010.
- [20] J. Fort, “Chronic renal failure: A cardiovascular risk factor,” *Kidney Int.*, vol. 68, pp. S25–S29, Dec. 2005.
- [21] R. L. Dumaine, G. Montalescot, P. G. Steg, E. M. Ohman, K. Eagle, and D. L. Bhatt, “Renal function, atherothrombosis extent, and outcomes in high-risk patients,” *Am. Heart J.*, vol. 158, no. 1, pp. 141–148.e1, Jul. 2009.
- [22] V. C. Chitalia *et al.*, “Uremic serum and solutes increase post-vascular interventional thrombotic risk through altered stability of smooth muscle cell tissue factor,” *Circulation*, vol. 127, no. 3, pp. 365–376, Jan. 2013.
- [23] E. W. Holy *et al.*, “Carbamylated Low-Density Lipoproteins Induce a Prothrombotic State Via LOX-1: Impact on Arterial Thrombus Formation In Vivo,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 68, no. 15, pp. 1664–1676, Oct. 2016.
- [24] H. Plé, M. Maltais, A. Corduan, G. Rousseau, F. Madore, and P. Provost, “Alteration of the platelet transcriptome in chronic kidney disease,” *Thromb. Haemost.*, vol. 108, no. 4, pp. 605–615, Oct. 2012.
- [25] N. Jain *et al.*, “Differences in Whole Blood Platelet Aggregation at Baseline and in

Response to Aspirin and Aspirin Plus Clopidogrel in Patients With Versus Without Chronic Kidney Disease," *Am. J. Cardiol.*, vol. 117, no. 4, pp. 656–663, Feb. 2016.

[26] T. Gawlowski *et al.*, "Advanced glycation end products strongly activate platelets," *Eur. J. Nutr.*, vol. 48, no. 8, pp. 475–481, Dec. 2009.

[27] M. Hangaishi *et al.*, "Increased aggregation of human platelets produced by advanced glycation end products in vitro," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 248, no. 2, pp. 285–292, Jul. 1998.

[28] E. Herczenik *et al.*, "Activation of human platelets by misfolded proteins," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no. 7, pp. 1657–1665, Jul. 2007.

[29] W. Zhu, W. Li, and R. L. Silverstein, "Advanced glycation end products induce a prothrombotic phenotype in mice via interaction with platelet CD36," *Blood*, vol. 119, no. 25, pp. 6136–6144, Jun. 2012.

[30] K. Ikeda *et al.*, "N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 35, no. 24, pp. 8075–8083, Jun. 1996.

LEGENDS

Table 1. Biological characteristics of animals groups

Data are mean plus or minus SEM.

RBC : Red blood cell, Hgb : Hemoglobin, Hct : Hematocrit

Table 2. Platelets characteristics

Data are mean plus or minus SEM.

PLT: Platelets. MPV: Mean platelet volume. ($n=5-9$)

Figure 1. Uremia accelerates arterial thrombus formation and RAGE deletion protects from uremia effect

A, Photographs show the progression of thrombus formation induced by FeCl_3 injury to carotid artery in ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} Sham and CKD mice. Platelets were labelled *in vivo* by injection of rhodamine 6G and thrombi imaged by fluorescence videomicroscopy. **B**, The dots plot represent time to complete occlusion. Means are indicated by horizontal bars \pm SEM ($n=5-8$ per group). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; **** $P<0,0001$; NS, nonsignificant. **C**, Embolic carotid observed during thrombus formation. Results are expressed as percentage of carotids embolized to total.

Figure 2. Surface expression of main receptors and RAGE in platelet

A, Western blot of lysate from resting platelets, probed with a rat monoclonal anti-RAGE antibody and the amount of proteins loaded was evaluated by monoclonal anti-actin antibody. Data are representative of two ApoE^{-/-} and two ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} Sham mice.

B, Surface expression in each groups of α_2 , GPIb β , GPVI, $\alpha IIb\beta 3$, CD36, GPIb α , as determined by flow cytometry with FITC-conjugated anti-mouse α_2 mAb (Sam.G4), GPIb β mAb (Xia.C3), GPVI mAb (JAQ1), CD41 mAb (MWReg30) or PE-conjugated anti-mouse CD36 mAb (D-2712), GPIb α mAb (Xia.B2). Results are expressed as mean fluorescence intensities (MFI) to isotypes control MFI: (MFI mAb – MFI isotypes) \pm SEM ($n=3$).

Figure 3. Uremia increases platelets reactivity

A, Platelet aggregation were measured in whole blood by impedance using Multiplate® analyzer. Platelets aggregation was induced by 5 µM of ADP (left panel) and 2,5 µg/mL of collagen (right panel). On the top are representative tracing from ApoE^{-/-} uremic mice in grey and ApoE^{-/-} Sham mice in black. On the bottom, a bar graph showing mean amplitudes of aggregation expressed in area under curve (AUC*min) ± SEM ($n = 6$ per group). *P<0,05.

B, Histograms of a representative flow cytometry assay to assess platelet activation via $\alpha IIb\beta 3$ activation and surface exposure of P-selectin in whole blood were determined with PE-conjugated JON/A (left panel) and anti-P-selectin (right panel). Activation was induced by thrombin (10mU/mL) (T) compare to basal (B). In lower panel, data represent the mean fluorescent intensity (MFI) of top panel of seven mice ± SEM. *P<0,05.

C, Platelet aggregation were measured in Platelet-rich plasma by turbidimetry using Soderel aggregometer. Platelets aggregation was induced by 50 or 100 mU/mL of Thrombin. On the top are representative tracing from ApoE^{-/-} uremic mice in grey and ApoE^{-/-} Sham mice in black. On the bottom, a bar graph showing mean amplitudes of aggregation expressed in percentage of light transmission using control PPP ± SEM ($n = 8$). *P<0,05; ***P<0,001.

Figure 4. RAGE deletion limits uremia effect on platelet functions

A, Platelet aggregation were measured in whole blood by impedance using Multiplate® analyzer. Platelets aggregation was induced by 5 µM of ADP (left panel) and 2,5 µg/mL of collagen (right panel). On the top are representative tracing from ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} uremic mice in grey and ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} Sham mice in black. On the bottom, a bar graph showing mean amplitudes of aggregation expressed in area under curve (AUC*min) ± SEM ($n = 5-6$ per group). **P<0,01.

B, Histograms of a representative flow cytometry assay to assess platelet activation via $\alpha IIb\beta 3$ activation and surface exposure of P-selectin in whole blood were determined PE-conjugated JON/A (left panel) and anti-P-selectin (right panel). Activation was induced by thrombin (10mU/mL) (T) compare to basal (B). In lower panel, data represent the mean fluorescent intensity (MFI) of top panel of five and eight mice ± SEM. NS, nonsignificant.

C, Platelet aggregation were measured in Platelet-rich plasma by turbidimetry using Soderel aggregometer. Platelets aggregation was induced by 50 or 100 mU/mL of Thrombin. On the top are representative tracing from ^{-/-}/RAGE^{-/-} uremic mice in grey and ^{-/-}/RAGE^{-/-} Sham mice in black. In mid, a bar graph showing mean amplitudes of aggregation expressed in percentage of light transmission using control PPP ± SEM ($n = 4$). **P<0,01. On the bottom, a table represent the disaggregation observed at 5 min with thrombin 100mU/mL. Results are expressed as percentage of disaggregation

Figure 5. Uremic condition and RAGE deletion do not induce a modification on platelet functions on washed platelets

A, Platelet aggregation was induced by 25, 50 or 100 mU/mL of Thrombin. On the left panel are representative bar graph from ApoE^{-/-} mice and the right ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} mice. A bar graph showing mean amplitudes of aggregation expressed in percentage of light transmission using Tyrode buffer control ± SEM ($n = 3$).

B & C, Activation of $\alpha II\beta 3$ (**B**) and surface exposure of P-selectin (**C**) in washed platelets were determined by flow cytometry. Activation was induced by 25 or 50 mU/mL of thrombin. On the left panel are representative histograms flow cytometry assay (top) and bar graph (lower) from ApoE^{-/-} mice and the right ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} mice. Data represent the mean fluorescent intensity (MFI) ± SEM ($n = 3$).

Figure 6. RAGE ligands accumulates in uremic environment are involved in uraemia induced platelets hyperactivity

A, Serum samples were collected from ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} Sham and IRC mice and CML concentration determined by LC-MS/MS. Results are expressed as CML concentration to total lysine concentration (mmol/mol). **B & C**, Washed platelets from ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-} Sham were incubated with RAGE ligands for 10 min and then assessed for aggregation in response to thrombin (25mU/mL). **B**, Platelets were incubated with Glycated-HAS (G) or No Glycated-HAS to control (NG-HAS). A bar graph showing mean percentage amplitudes of aggregation normalized to control ± SEM ($n = 3$). *P<0,05. **C**, Platelets were incubated with increased concentration of S100A12. A bar graph showing mean percentage amplitudes of aggregation normalized to control ± SEM ($n = 3-5$). *P<0,05; **P<0,01

Table 1

	ApoE ^{-/-}		ApoE ^{-/-} /RAGE ^{-/-}				
	Sham	CKD	Sham	CKD			
Urea (mmol/L)	9,8 ± 0,43	23,7 ± 2,05	**	9,4 ± 0,47	21,3 ± 1,70	**	
Creatinin (mmol/L)	10,9 ± 0,73	22,8 ± 1,31	*	11,5 ± 0,77	17,7 ± 2,27	*	
Triglyceride (mmol/L)	0,9 ± 0,04	1,4 ± 0,19	ns	1,1 ± 0,1	#	1,2 ± 0,10	ns
Cholestrol (mmol/L)	8,2 ± 0,73	16,0 ± 1,51	**	9,1 ± 0,9	14,3 ± 2,27	**	
Calcium (mmol/L)	2,0 ± 0,09	1,9 ± 0,09	ns	1,9 ± 0,08	2,2 ± 0,06	ns	
Phosphorus (mmol/L)	2,2 ± 0,27	2,6 ± 0,09	ns	2,6 ± 0,25	2,8 ± 0,15	ns	
RBC (M/mm3)	7,8 ± 0,2	6,2 ± 0,2	*	8,4 ± 0,3	6,6 ± 0,2	****	
Hgb (g/dL)	10,8 ± 0,2	9,1 ± 0,2	*	11,8 ± 0,4	8,5 ± 0,3	****	
Hct (%)	36,8 ± 0,4	30,5 ± 0,1	*	39,4 ± 1,3	30,1 ± 0,6	****	

Figure 1

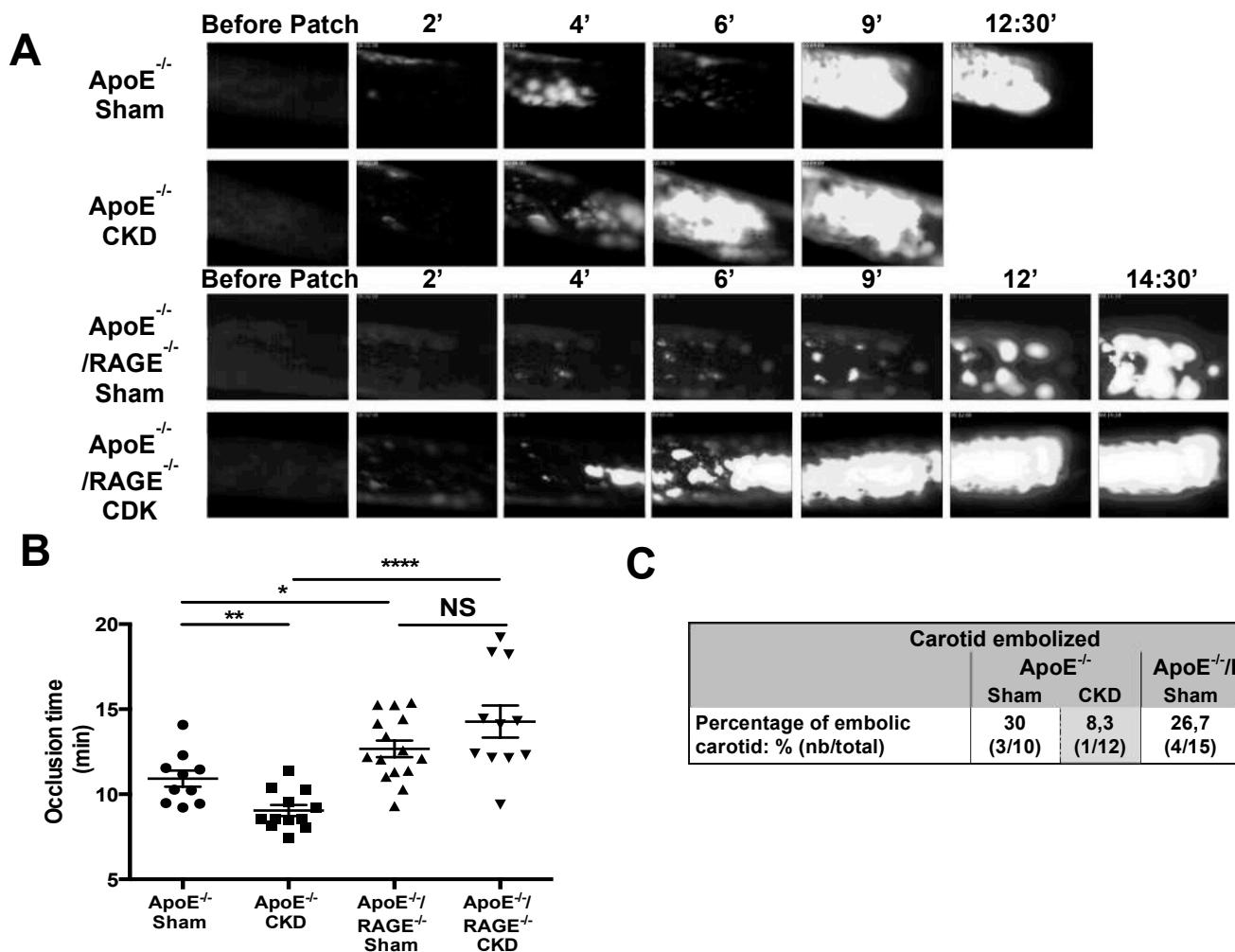


Table 2

	ApoE ^{-/-}		ApoE ^{-/-} /RAGE ^{-/-}	
	Sham	CKD	Sham	CKD
PLT (m/mm3)	1027,2 ± 103,3	1188,8 ± 234,5	1100,8 ± 133,1	1396,6 ± 209,7
MPV (fL)	6,5 ± 0,1	6,4 ± 0,1	6,3 ± 0,1	6,1 ± 0,2

Figure 3

■ ApoE^{-/-} Sham
■ ApoE^{-/-} CKD

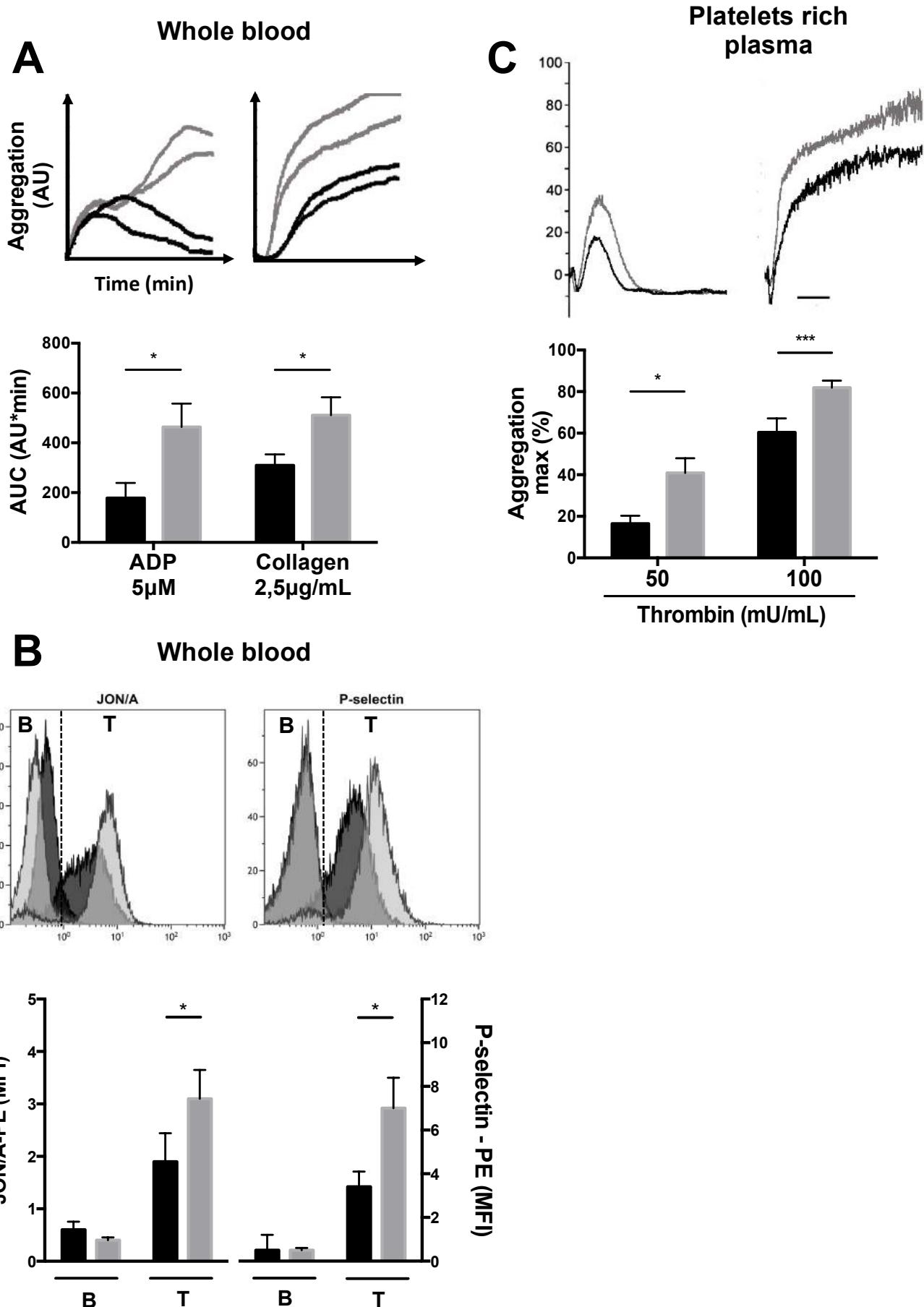


Figure 4

■ ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}
Sham
■ ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}
CKD

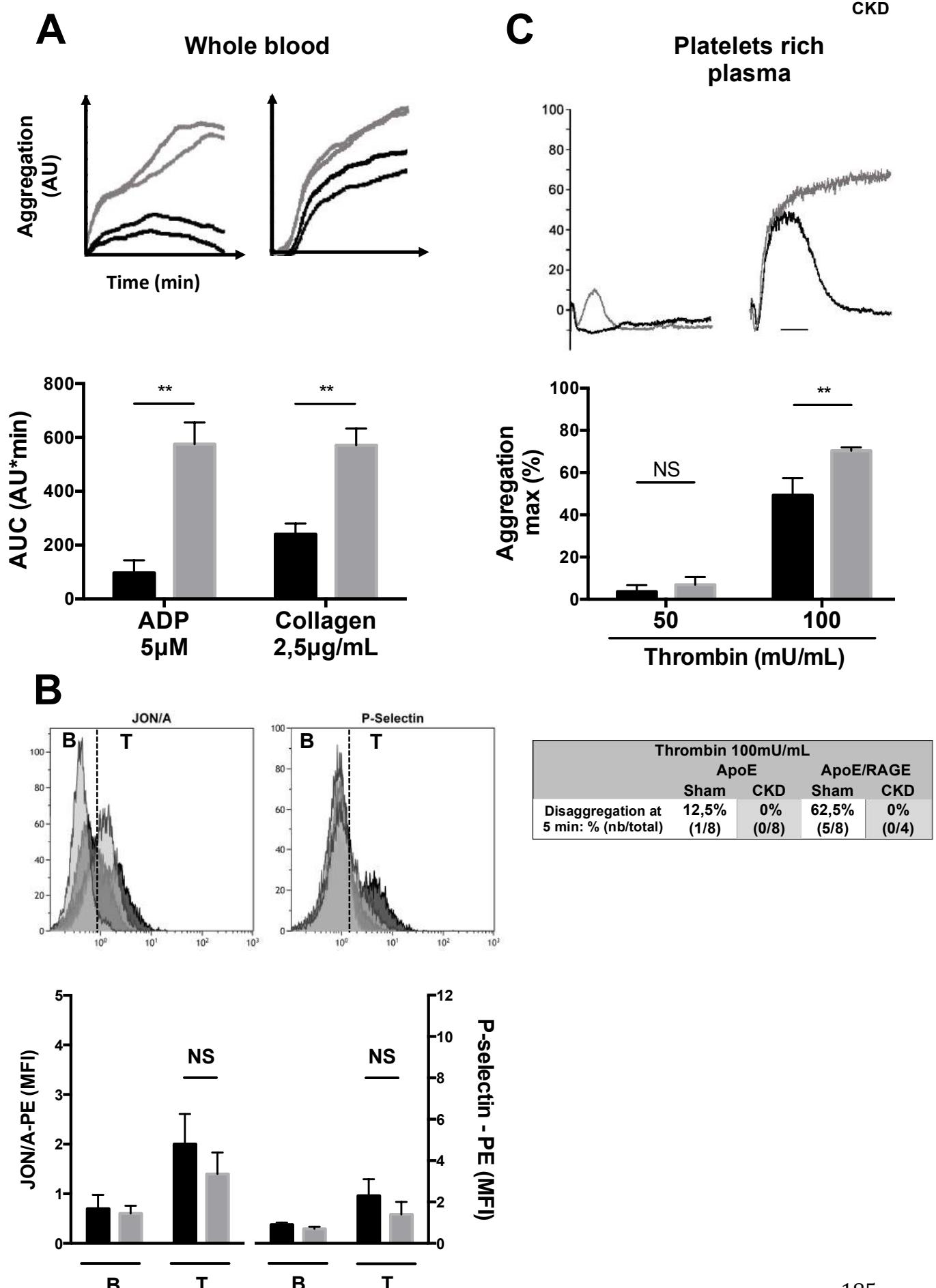


Figure 5

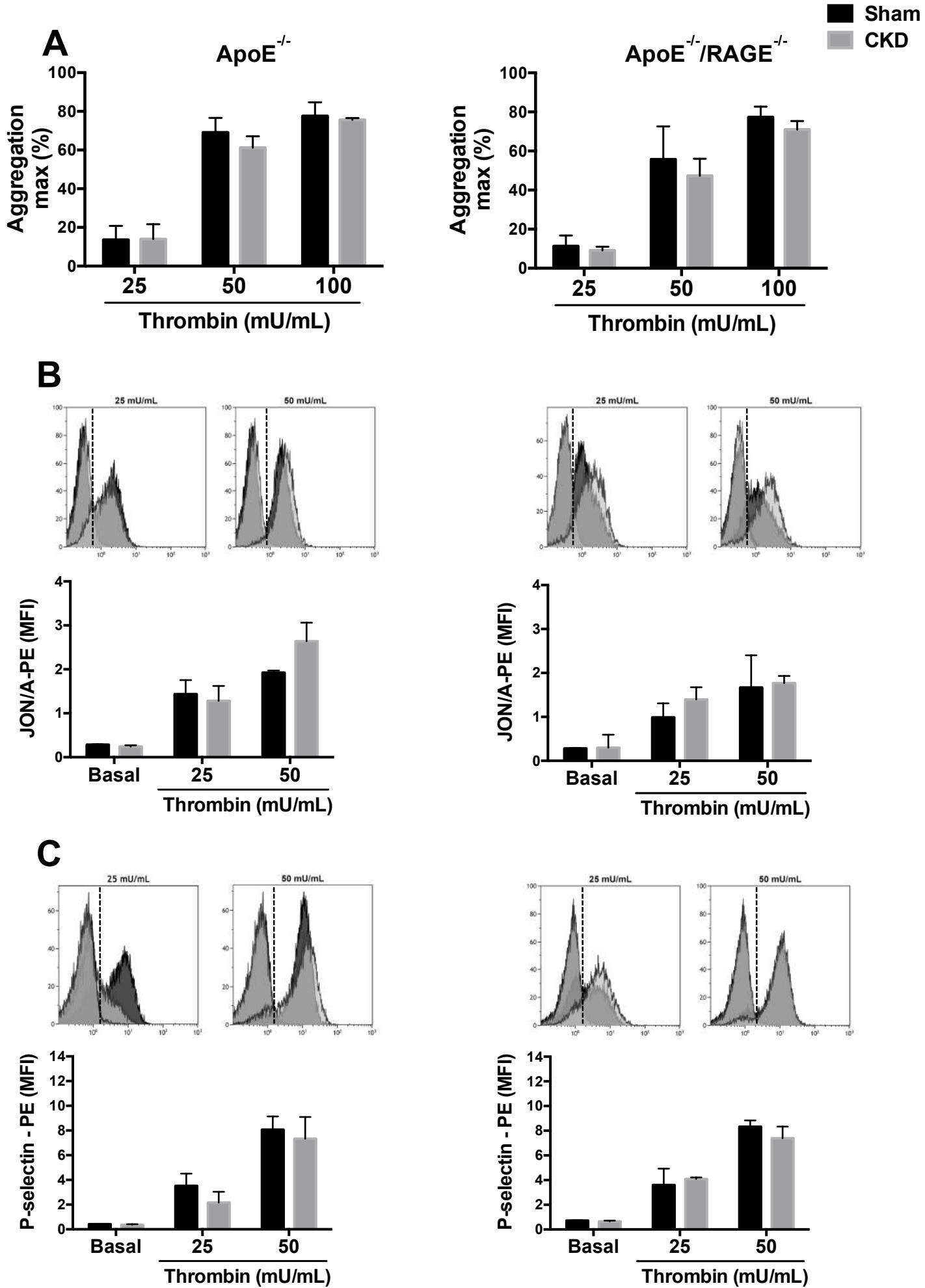
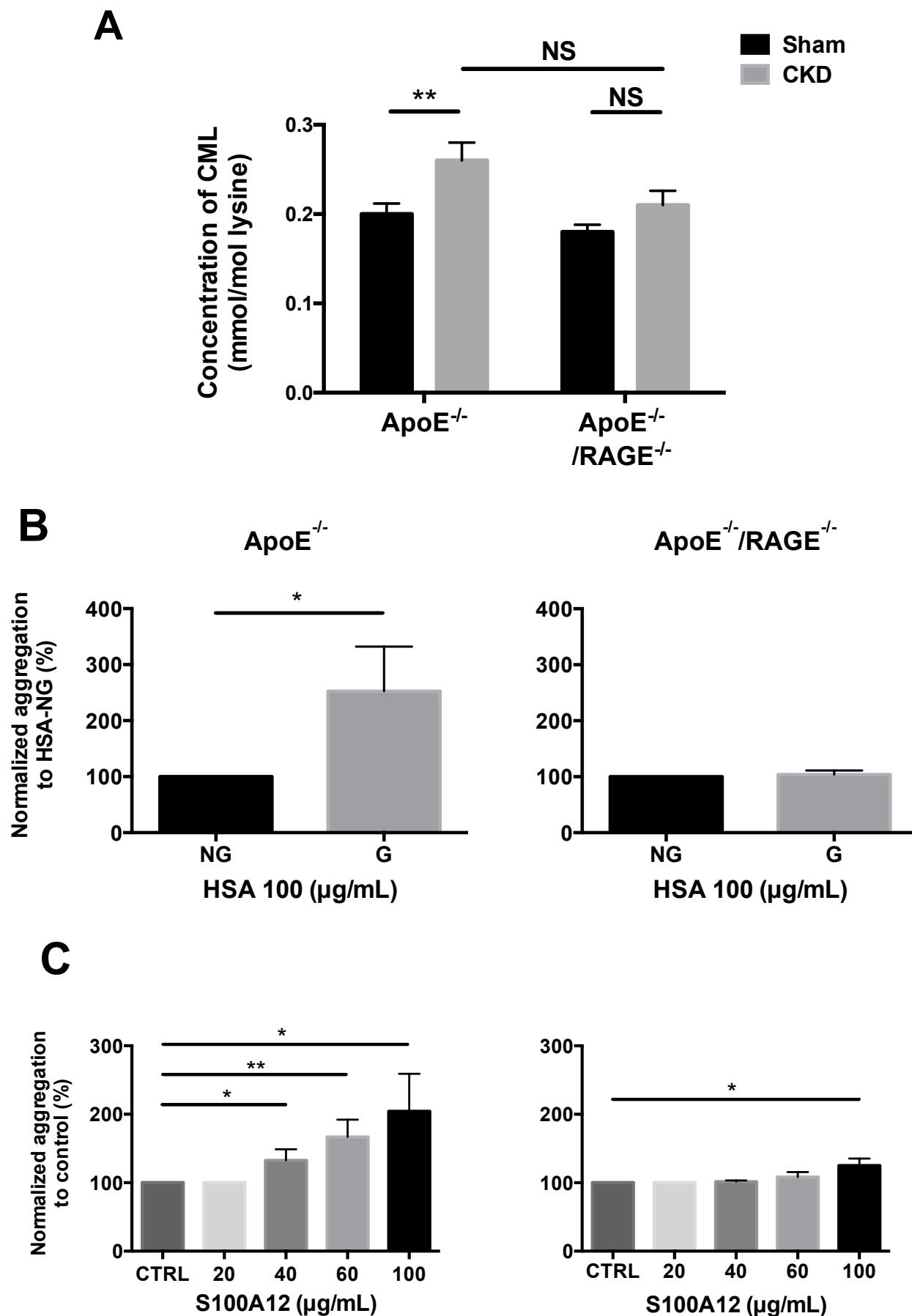


Figure 6



Chapitre III : Discussion générale et perspectives

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est une pathologie fréquente (5-10% de la population), elle est due à une perte progressive et irréversible des fonctions rénales, par réduction du parenchyme fonctionnel au cours de différentes pathologies rénales. Les reins permettent l'excrétion des déchets. Lorsque le niveau de la fonction rénale devient inférieur au seuil critique, défini comme l'insuffisance rénale terminale, le maintien de l'homéostasie n'est plus possible et le recours aux traitements de suppléance par dialyse ou transplantation s'impose.

L'IRC induit un vieillissement accéléré des vaisseaux et augmente considérablement le risque de complications cardiovasculaires. Ces complications font suite à des modifications structurelles et fonctionnelles de la paroi vasculaire appelées vasculopathie urémique et qui regroupent l'athérosclérose, les calcifications vasculaires, la rigidité artérielle et la thrombose artérielle.

Au cours de l'IRC les substances non épurées par les reins s'accumulent, certaines d'entre elles ont la capacité de moduler les fonctions cellulaires et sont appelées toxines urémiques. Parmi ces toxines nous sommes intéressés particulièrement aux produits de glycation avancée (AGEs) et les ligands de RAGE. Les AGEs résultent d'une réaction entre un groupement lysine ou arginine d'une protéine et le groupement carbonyl d'un sucre (produit par la réaction de Maillard), suivi d'un réarrangement en un produit d'Amadori stable, tel que la carboxymethyllysine (CML, ou la pentosidine). Ces AGEs et d'autres ligands de RAGE tels que les protéines de la famille des S100 ou la Sérum Amyloïde A (SAA) peuvent interagir avec le récepteur aux AGEs, RAGE.

RAGE est un récepteur multiligand de la super-famille des immunoglobulines, retrouvé à la surface de toutes les cellules. RAGE et ses ligands ont déjà été impliqués dans le remodelage vasculaire, notamment au cours du diabète. Ainsi, dans le modèle murin de souris ApoE^{-/-} validé comme modèle d'athérosclérose accélérée, il a été mis en évidence que l'expression de RAGE et de ses ligands était augmentée et que la formation de la plaque d'athérome était prévenue par la délétion de RAGE. Cependant le rôle de l'interaction AGE-RAGE dans les modifications vasculaires au cours de l'urémie reste mal connu.

Nos travaux ont eu, pour premier objectif, d'évaluer la cinétique d'accumulation de la SAA, au cours de l'IRC, ainsi que son implication dans l'apparition des plaques d'athérome *via* l'activation de RAGE. Le second objectif a consisté en l'étude de l'apparition des calcifications vasculaires au cours de l'IRC, induites par une ostéodifférenciation des CMLv *via* l'intermédiaire de RAGE. Le remodelage de la paroi artérielle comme l'athérosclérose ou les calcifications, fragilise la plaque d'athérome, et est souvent associé à la survenue d'évènements thrombotiques qui constituent les complications cardiovasculaires aigües. Dans ce cadre, le dernier objectif de la thèse a consisté en l'étude de l'effet de l'IRC sur la thrombose, et de comprendre le rôle de RAGE sur l'activité plaquettaire.

Dans un premier article (article 1, pages 81-98), nous avons montré, pour la première fois dans un modèle murin rendu urémique et possédant une délétion pour RAGE, que cette délétion réduisait l'apparition des plaques d'athérome au cours de l'IRC. En outre, la SAA module la migration des CMLv de manière RAGE dépendante. Ces données indiquent que la Sérum Amyloïdes A, considérée comme une toxine urémique, est un acteur important dans l'athérosclérose accélérée au cours de l'urémie *via* l'activation de RAGE.

Il a été montré dans des études précédentes, une présence de RAGE importante au sein des plaques d'athérome, dans un modèle murin d'IRC [282]. De plus Bro et collaborateurs, montrent que le traitement de souris rendues urémiques par un anticorps bloquant RAGE réduisait l'apparition des plaques d'athérome [276]. L'équipe de Schmidt a également montré chez des souris rendues diabétiques, une élévation du taux sérique en AGEs corrélée à la formation de plaques d'athérome, et que l'injection de sRAGE stabilise cette formation [240]. Parmi les ligands de RAGE, la Sérum Amyloïde A est retrouvée au niveau des plaques d'athérome mais elle est également augmentée au cours de l'IRC [189], [271].

Nos résultats offrent d'intéressantes perspectives de travail. D'un point de vue clinique, la concentration sérique en SAA peut augmenter fortement, de 100 à 1000 fois par rapport à son taux normal en 24h, lors d'infections aigües. Elle a également une demi-vie très courte lorsqu'elle est libre dans la circulation sanguine. Cependant, 95% de la SAA est fixée au HDL, modifiant les propriétés protectrices des HDLs sur les maladies

cardiovasculaires, conduisant à une rétention de ces derniers au niveau de la MEC sous-endothéliale. Il serait donc intéressant d'inhiber la production de SAA, ou son interaction avec les HDL, afin de limiter l'inflammation de la paroi artérielle. La possibilité d'inhiber l'interaction entre la SAA et RAGE permettrait également de limiter ce phénomène.

Dans le cadre du second article, (pages 102-142), nous avons montré dans un modèle murin d'IRC, une accumulation de ligands de RAGE comme la CML et les protéines de la famille des S100, parallèlement à la formation de calcifications au niveau des valves aortiques et de l'aorte. Il a également été démontré que la délétion de RAGE protège la formation de cette calcification vasculaire induite par l'IRC.

De plus, nous avons pu mettre en évidence, *in vitro* sur des cultures primaires de CMLv stimulées avec du S100A12, la présence de calcifications extracellulaires, parallèlement à l'augmentation de marqueurs de l'ostéodifférenciation comme Runx2, BMP2 et le collagène de type I. Là encore, les CMLv issues de souris RAGE^{-/-} sont protégées de cette différenciation phénotypique. Nous avons également constaté que la délétion de RAGE protégeait les effets pro-calcifiants induits par le phosphate inorganique (Pi). Par la suite, la recherche d'une voie de signalisation commune au Pi et aux ligands de RAGE nous a amené à étudier le co-transporteur du phosphate (Pit-1). Nous avons donc montré que la délétion de RAGE, modulait l'augmentation de l'expression de Pit-1, *in vivo* au cours de l'IRC, et *in vitro* induite par le Pi ou les ligands de RAGE via l'augmentation des ROS. Nous avons également mis en évidence que l'augmentation des ROS favorisait la production des ligands de RAGE.

En accord avec nos résultats, plusieurs études ont montré le rôle de l'interaction de RAGE et de ses ligands dans la mise en place de la calcification vasculaire médiée par différentes voies de signalisation telles que les ROS, les MAPK ou encore ERK1/2, mais également que RAGE est impliqué dans la calcification au cours du diabète [262]–[264]. L'ensemble de ces résultats suggère pour la première fois dans un modèle de souris urémique et délété pour RAGE, que celui-ci est un acteur important dans la mise en place de la calcification vasculaire en modulant l'expression de Pit-1 par la voie des ROS.

Le calcium est un acteur important au cours de la formation de calcification vasculaire, une perspective de recherche pourrait être d'étudier le rôle de RAGE dans la régulation de l'entrée de calcium intracellulaire. En effet, plusieurs canaux calciques

voltage-dépendants sont exprimés à la surface des CMLv, et peuvent être impliqués au cours de l'ostéodifférenciation de ces dernières. Les CMLv, avec un phénotype contractile expriment fortement le canal Ca^{2+} voltage-dépendant de type L permettant l'entrée du calcium indispensable à la contraction cellulaire. Lors du changement phénotypique des CMLv, l'expression des canaux de type L est diminuée tandis que celle du canal de type T et de l'échangeur sodium/calcium augmente. Cette augmentation d'expression de ces canaux induit une forte entrée de calcium intracellulaire conduisant à l'augmentation de l'expression de Runx-2, de Pit-1, ainsi que de métalloprotéases. Par ailleurs, la forte concentration en calcium initie l'apoptose des CMLv, formant des corps apoptotiques, ainsi que des vésicules matricielles pro-calcifiantes [283], [284]. De plus, le récepteur sensible au calcium (CaSR) est également impliqué dans la formation de la calcification vasculaire, puisque son activation au niveau des CMLv réduit la minéralisation de la MEC via l'expression d'inhibiteur de la calcification telle que la MGP. La diminution de l'expression de CaSR a été observée dans des plaques d'athérome calcifiées de patients non urémiques, mais également au niveau de la paroi vasculaire de patients insuffisant rénaux [285]–[287]. Nous avons montré que RAGE pouvait moduler l'expression de Pit-1. Il serait également intéressant d'étudier l'influence de son activation sur l'expression des différents canaux calciques, ou sur le CaSR au cours de l'IRC.

L'une des conséquences principales des calcifications vasculaires est la rigidification de la paroi vasculaire conduisant, à une hypertrophie ventriculaire et des complications cardiovasculaires plus importantes. Les principales fonctions du système artériel sont d'assurer une circulation adéquate du flux vers les tissus et les organes, mais également d'amortir la pression oscillante du flux pulsatile. L'efficacité de ces fonctions dépend des propriétés géométriques et élastiques de la paroi artérielle, donnant la capacité aux grandes artères de tamponner la pression et à transformer le flux sanguin cyclique dans l'aorte en écoulement continu au niveau des capillaires. Une augmentation de la rigidité artérielle est associée à une augmentation du travail cardiaque, ainsi que la transmission du flux oscillant dans la microcirculation. Au cours de l'IRC, le remodelage artériel causé en parti par la dégradation de l'élastine, mais également par le dépôt de collagène de type I et la minéralisation de la paroi, sont des facteurs amplifiant la rigidité artérielle. Il a été montré que la présence de calcifications, corrélée à une rigidité importante de la paroi vasculaire était liée à une forte mortalité

chez les patients urémiques [288]–[291]. Une étude a montré, dans un modèle murin, que l'apport alimentaire de ligand de RAGE comme la CML induisait une augmentation de la rigidité artérielle. Mais également, la délétion de RAGE protégeait de cette rigidité induite par un régime riche en AGEs [292]. Une des perspectives de nos travaux est donc d'étudier l'impact de RAGE sur la rigidité artérielle au cours de l'IRC dans notre modèle murin. Dans ce contexte, le plateau technique de l'animalerie de l'université de Reims a récemment acquis un mouse doppler (Indus Instrument, USA, Houston). Cet appareil nous permet de mesurer la vitesse de l'onde de pouls (VOP) entre la crosse de l'aorte et l'aorte abdominale (Figure 21).

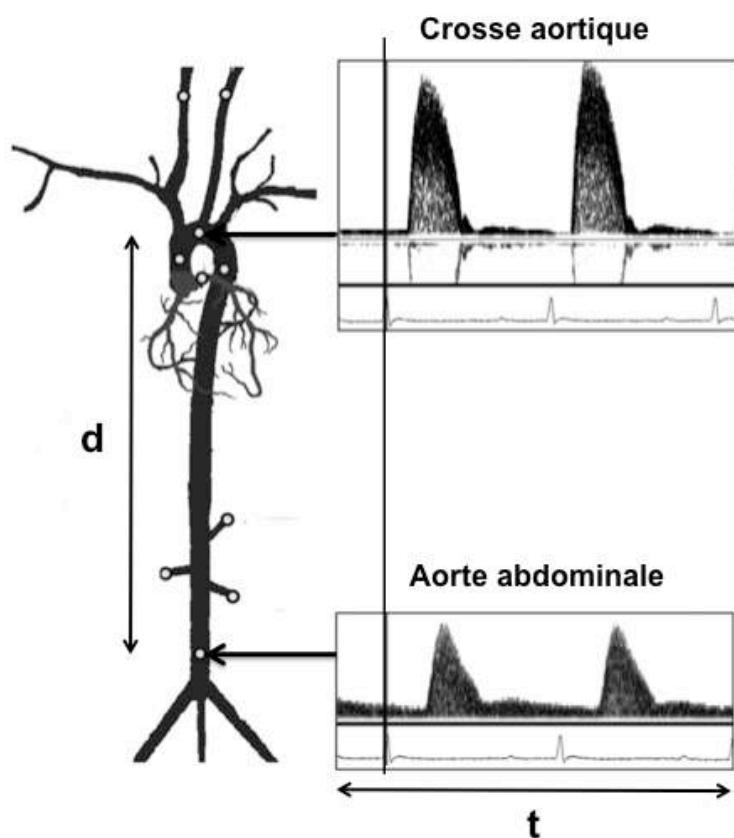


Figure 21 : Représentation de signaux effectués au niveau de la crosse aortique et de l'aorte abdominale. (modifié d'après Hartley [293])

La ligne verticale correspond à l'onde R de l'ECG en dessous du signal du doppler et est utilisée pour mesurer le temps (t) d'arrivée d'un pulse et ainsi calculer la vitesse de l'onde de pouls par rapport à la distance (d) entre les deux électrodes.

Pour cela nous avons effectué une cinétique sur 12 semaines de la mesure de l'onde de pouls sur des souris rendues urémiques, délétées ou non pour RAGE. Nous avons observé une augmentation de la VOP chez les souris ApoE^{-/-} après 2 semaines d'IRC, se maintenant jusqu'à 12 semaines d'urémie. Cependant, l'IRC n'induit pas d'élévation de la

VOP chez les souris ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}. La délétion de RAGE protège donc de la rigidité artérielle induite par l'IRC. Ces résultats préliminaires montrent que RAGE est impliqué au cours de la rigidité artérielle induite par l'IRC (Figure 22).

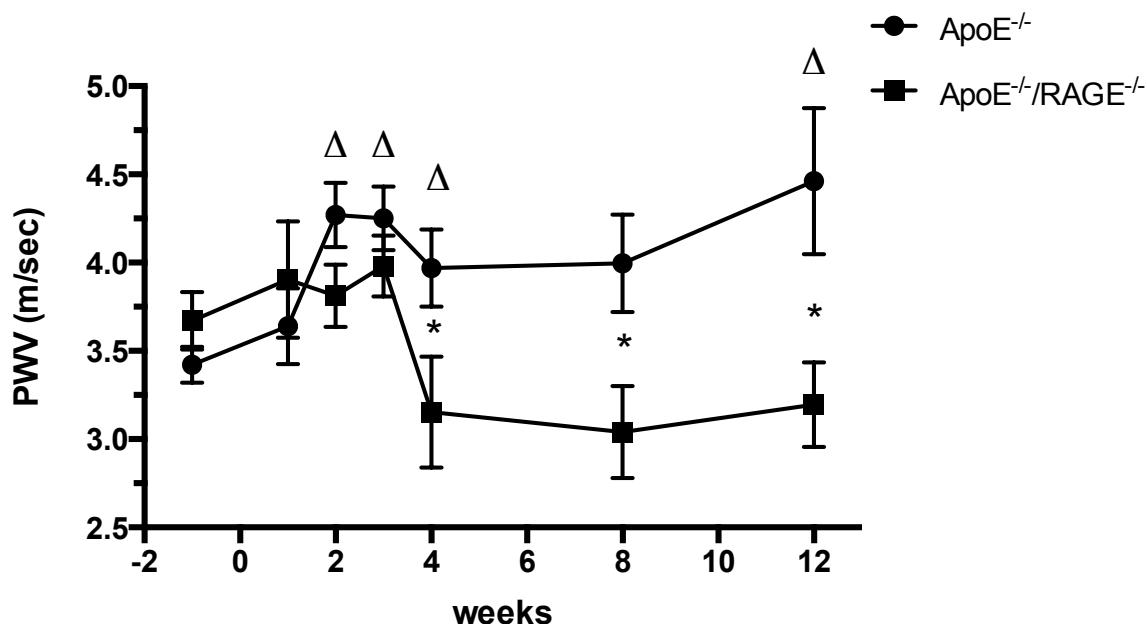


Figure 22 : Cinétique de la vitesse de l'onde de pouls au cours de l'IRC chez des souris rendues urémiques délétees ou non pour RAGE

Une mesure a été effectuée une semaine avant les chirurgies afin d'avoir une valeur de référence en comparaison des différents temps suite à l'induction de l'IRC. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM de 6-7 souris par génotype. (Analyse statistique : Mann-Whitney, $\Delta P<0,05$ ApoE^{-/-} vs ApoE^{-/-} avant induction IRC ; $*$ $P<0,05$ ApoE^{-/-} vs ApoE^{-/-}/RAGE^{-/-}).

Dans le cadre d'une troisième étude (article 3, pages 146- 181), nous avons montré, pour la première fois, que RAGE pouvait être un acteur de l'hémostase et de la thrombose. Nous avons pu montrer, dans un modèle murin, que l'IRC induisait une accélération significative du temps d'occlusion artérielle, suite à une lésion carotidienne induite par un patch de perchlorure de fer, et que la délétion de RAGE, protègeait de cette accélération liée à l'IRC.

En collaboration avec le laboratoire du Pr Philippe Nguyen (Laboratoire central d'hématologie, CHU Reims), et avec l'aide du Dr Nathalie Hézard, nous avons également montré *ex vivo* qu'il y avait, au cours de l'IRC, une augmentation significative de l'agrégation plaquettaire dans les deux génotypes, en sang total. Mais, l'IRC induit également une augmentation des marqueurs d'activation plaquettaire, et la délétion de RAGE réduit cette augmentation contrairement à ce qui est observé pour l'agrégation. Ces deux expériences ont démontré que l'IRC induisait une hyperréactivité plaquettaire mais que le rôle de RAGE n'était pas clair. En effet, nous supposons que les manipulations effectuées sur l'agrégomètre en sang total, ne permettaient pas d'observer de différences entre les deux génotypes, puisque nous devions utiliser des doses d'agonistes relativement importantes pour induire une agrégation. De plus, l'influence des autres cellules circulantes peuvent jouer un rôle important au cours de l'activation et de l'agrégation plaquettaire, et ces facteurs ne peuvent pas être contrôlés durant ces manipulations. Cependant, l'étude des marqueurs d'activation plaquettaire, en cytométrie en flux, permet d'utiliser de faibles doses d'agonistes. En effet, des concentrations faiblement activatrices permettaient d'observer des différences entre les deux génotypes.

Nous nous sommes alors intéressés à l'étude de l'agrégation plaquettaire en plasma riche en plaquettes (PRP), à l'aide d'un agrégomètre par turbidimétrie. Cet appareil est plus sensible qu'en sang total et permet de s'affranchir des autres cellules circulantes. Nous avons montré, en PRP, que l'IRC induisait une augmentation de l'agrégation plaquettaire, induite par la thrombine. De plus, la délétion de RAGE réduit ce phénomène.

L'étude de la fonction plaquettaire en plaquettes lavées (isolées de l'environnement plasmatique et des autres cellules circulantes), nous a permis de mettre en évidence que les plaquettes, en réponse à un agoniste, réagissaient de la même manière quelque soit

le génotype et la condition d'urémie ou non.

L'incubation d'AGEs ou de ligand de RAGE avec des plaquettes lavées, a également montré une réactivité plus importante de celles-ci, en réponse à un agoniste plaquettaire, et que la délétion de RAGE n'induisait pas cette hyperréactivité induite par les différents ligands de RAGE. En conclusion, nous avons montré que les AGEs et les ligands de RAGE accumulés au cours de l'IRC, induisent une hyperréactivité plaquettaire *via* l'activation de RAGE.

L'effet potentialisateur des AGEs et des ligands de RAGE sur l'agrégation plaquettaire a déjà été observé par plusieurs équipes. En cohérence avec nos résultats, ils suggèrent que la pré-incubation de plaquettes avec de la BSA-AGE ou des β amyloïdes induit une augmentation significative de l'agrégation en réponse à différents agonistes [256]. Cependant, ces différents ligands peuvent cibler plusieurs récepteurs, Zhu et collaborateurs ont montré que cette agrégation induite par la BSA-AGE était CD36 dépendante [258]. Une autre équipe a également décrit que HMGB1 est un médiateur de l'activation plaquettaire *via* l'intermédiaire d'une signalisation TLR4 dépendante [294]. A l'inverse, Ahrens et collaborateurs ont récemment démontré que l'activation plaquettaire par la thrombine induisait une augmentation de la fixation de HMGB1 à la surface plaquettaire *via* une augmentation de l'exposition de RAGE à la membrane [295].

Nos résultats offrent d'intéressantes perspectives de travail. D'un point de vue mécanistique, l'activation de RAGE à la surface plaquettaire est encore mal connue. La présence de RAGE au sein des plaquettes a été peu décrite dans la littérature, seule une équipe a montré la présence d'ARNm de RAGE plaquettaire [295], tandis qu'une seconde équipe observe une augmentation de la présence de RAGE à la membrane plaquettaire après incubation d'AGEs provenant de Coca-Cola® [169]. Il serait intéressant d'étudier les modalités d'expression du RAGE plaquettaire au cours du vieillissement physiologique mais également au cours de l'IRC. La durée de vie des plaquettes est très courte, environ 7 à 10 jours, avec chaque jour 10^{11} plaquettes produites, celles-ci possèdent donc un pool d'ARNm permettant d'assurer la formation de protéines. Il serait intéressant d'étudier la transcription de RAGE, dès la naissance des plaquettes au niveau des mégacaryocytes, conduisant à la quantité d'ARNm transmise aux plaquettes lors de leur formation. Ou encore, étudier la régulation de la traduction ainsi que de la dégradation de celui-ci pourrait permettre de comprendre l'influence de RAGE sur la

réponse plaquettaire.

De plus, l'activation de RAGE dans d'autres types cellulaires conduit à l'activation d'une multitude de voies de signalisation. L'une d'entre elles est la voie PI3K/Akt. Cette voie est importante dans l'activation, ainsi que le maintien de l'agrégation plaquettaire. Au niveau des plaquettes murines, il existe deux isoformes de Akt. La délétion de Akt-1 ou de Akt-2 induit un défaut d'activation, de sécrétion et d'agrégation plaquettaire [296], [297]. L'activation de Akt induit également l'activation d'un signal « inside-out », pouvant induire l'activation de l'intégrine α IIb β 3, permettant un changement de conformation de celle-ci et d'induire une forte agrégation plaquettaire [298]. Au cours de nos travaux, nous avons pu observer une agrégation moins importante et non stable, parallèlement à une réduction de l'activation de l'intégrine α IIb β 3, ainsi qu'une diminution de l'exposition de la P-sélectine chez les souris délétées pour RAGE. L'étude de la voie PI3K/Akt serait donc une piste intéressante au cours de l'activation plaquettaire médiée par RAGE.

La réorganisation du cytosquelette d'actine est également une étape importante dans l'agrégation, la sécrétion, l'étalement plaquettaire et la formation du thrombus. La famille des RhoGTPases sont des régulateurs importants du cytosquelette plaquettaire. Il a été montré que RAGE a la capacité d'activer Rac-1 et Cdc42 *via* l'intermédiaire de mDia-1, induisant une migration de cellules tumorales mais également de CMLv [223], [300]. Le rôle de RAGE dans la réorganisation du cytosquelette pourrait également expliquer l'effet de celui-ci lors de l'agrégation plaquettaire.

Une autre perspective de recherche pourrait être d'étudier le rôle de la paroi artérielle au cours de l'IRC et sa capacité à générer du FT ainsi que de la thrombine, modulés par l'activation de RAGE et conduisant à la formation d'un thrombus. Le FT est une glycoprotéine transmembranaire qui initie la coagulation par la liaison du facteur VII dans sa forme activée (VIIa). Ce complexe protéolytique, active le facteur IX et X puis la cascade de coagulation menant à la génération de thrombine. En effet, plusieurs études ont montré une augmentation du taux de FT chez les patients insuffisants rénaux [301], [302]. En effet, certaines toxines urémiques comme l'indoxylo sulfate et l'acide indole 3-acétique sont capables d'induire l'expression de FT au niveau des cellules endothéliales [303]. Au cours de l'IRC, l'hypertension artérielle pourrait également être

une source de production de FT. Effectivement l'expression du FT a également été augmentée au niveau des CMLv de rats hypertendus conduisant à une augmentation de la génération de thrombine responsable d'un phénotype prothrombotique [304].

En outre, d'autres études ont montré que l'activation de RAGE induit l'expression de FT au sein de cellules endothéliales [252], de monocytes [254], mais également dans la paroi vasculaire chez des souris rendues diabétiques [253]. Ainsi RAGE pourrait avoir un effet prothrombotique au niveau de la paroi vasculaire au cours de l'IRC.

Les neutrophiles jouent également un rôle clé dans les processus thrombotiques. Ils sont essentiels au cours de l'immunité innée et peuvent adhérer rapidement et migrer au travers de l'endothélium suite à une lésion tissulaire ou une invasion microbienne. Le dysfonctionnement des neutrophiles peut contribuer à la morbidité et la mortalité au cours de l'IRC [305]. Les neutrophiles activés peuvent subir un processus de nétose, appelé également *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) [306]. Les NETs forment un réseau extracellulaire de chromatine, composé principalement d'histones et de protéines antimicrobiennes libérées par les neutrophiles. Initialement, la nétose a été décrite comme un mécanisme antimicrobien par lequel les pathogènes se retrouvent piégés dans une structure en forme de filet. Cependant, la composition de ce « filet » peut également piéger et induire l'activation et l'agrégation plaquettaire ou encore activer la cascade de coagulation, et ainsi former un thrombus [307]. Plusieurs études ont montré que RAGE est capable d'induire la formation de NETs dans certaines pathologies comme le cancer du pancréas [308], les maladies inflammatoires [309], mais également lors de la formation de thrombose veineuse *via* la libération de HMGB1 conditionnant l'activation plaquettaire [310]. Il serait donc intéressant d'étudier l'implication de RAGE dans la formation de NETs et la survenue d'événements thrombotiques au cours de l'IRC.

L'équipe de recherche dans laquelle j'ai effectué ma thèse s'intéresse également à une autre modification post-traductionnelle non-enzymatique participant au vieillissement tissulaire physiologique, mais est également amplifiée au cours de l'IRC : la carbamylation. Cette réaction est due à la fixation d'acide isocyanique, qui est un métabolite dérivé de l'urée, sur les groupements aminés des protéines, conduisant à la formation de produits de carbamylation (CDPs). Dans la littérature, il a été décrit que la

carbamylation des LDL était un facteur de risque cardiovasculaire chez les patients insuffisants rénaux [311]. Des études *in vitro* ont montré que les LDL carbamylées (cLDL) induisaient une cytotoxicité cellulaire sur les cellules endothéliales, ainsi qu'une prolifération des CMLv. L'adhésion des monocytes circulants aux cellules endothéliales est favorisée par l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion tel que ICAM-1 et VCAM-1 [312], [313]. De plus, il a été montré que l'incubation de cellules endothéliales avec du cyanate induisait une dysfonction endothéliale conduisant l'expression de molécules pro-thrombotiques comme PAI-1 et le FT [314]. Il a récemment été démontré que la carbamylation du fibrinogène induisait la formation d'un caillot de fibrine plus résistant à la fibrinolyse induite par la plasmine [315]. Ces différentes études démontrent que ces produits issus de la carbamylation ont la capacité d'induire des effets pro-athérogènes et pro-thrombogènes, suggérant leur importance dans le développement de l'athérosclérose et de la thrombose au cours de l'IRC.

Devant les nombreux effets délétères de RAGE au cours de la vasculopathie urémique, il est important de comprendre les différents mécanismes de RAGE, afin de développer des stratégies préventives ou thérapeutiques pour diminuer les risques de complications cardio-vasculaires. D'une part, un contrôle des apports exogènes en ligand de RAGE par des régimes pauvres en AGEs, permettrait de ralentir l'accumulation des AGEs sériques. D'autre part, bloquer ou réduire l'activation de RAGE par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques serait donc une priorité. En effet, plusieurs équipes ont montré que l'inhibition pharmacologique de RAGE était protectrice dans différentes pathologies en utilisant plusieurs stratégies.

Le premier concept exploré reposait sur l'utilisation d'antagonistes de RAGE, *via* l'utilisation de forme soluble du récepteur, essentiellement la partie extracellulaire de RAGE (les domaines V-C1-C2), exprimée et purifiée à partir de bacculovirus. Chez des souris diabétiques atteintes d'athérosclérose ou soumises à une blessure cutanée, mais également atteintes de néphropathie diabétique, il a été montré que l'administration de sRAGE était protectrice dans ces différents cas [316]–[318]. L'administration d'anticorps bloquant RAGE a également montré un rôle bénéfique au cours du développement de l'athérosclérose [171]. Plus récemment l'utilisation de peptides aptamers et de petites molécules antagonistes ont également été testés afin d'inhiber l'interaction des ligands avec RAGE [319], [320].

Dans ces différents cas, la cible principale contre RAGE se concentre sur les domaines extracellulaires de RAGE. Cependant, plusieurs études suggèrent que les ligands de RAGE ne se lient pas tous sur le même domaine extracellulaire. Même si le domaine V est le site majeur de la fixation des ligands, il a été montré que le S100A13 est capable d'interagir avec le domaine C2 [321].

Pour cette raison d'autres stratégies ont été mises en place visant le domaine intracellulaire de RAGE. En effet la signalisation de RAGE est dépendante de protéines adaptatives telle que mDia-1, qui interagit avec le domaine cytoplasmique de RAGE. Parmi plus de 59 000 molécules répertoriées dans la ChemBridge banque, seules 13 ont montré une habilité à inhiber l'interaction de mDia1 et de RAGE. Cette étude a également montré que ces molécules diminuent la signalisation induite par RAGE au niveau des cellules endothéliales, des CMLv et des monocytes/macrophages, mais sont également capables de réduire l'expression de marqueurs inflammatoires (IL-6 et TNF α) chez des souris traitées par ces molécules, ayant reçu une injection de ligand de RAGE [322].

Annexes

Publications

A. Goury, A. Meghraoui-Kheddar, K. Belmokthar, V. Vuiblet, **J. Ortillon**, S. Jaisson, J. Devy, R. Le Naour, T. Tabary, J.H. Cohen, A.M. Schmidt, P. Rieu, F. Touré. « Deletion of receptor for advanced glycation end products exacerbates lymphoproliferative syndrome and lupus nephritis in B6-MRL Fas lpr/j mice ». *J Immunol.* 2015 Apr 15;194(8):3612-22.

K. Belmokthar, T. Robert, **J. Ortillon**, A. Braconnier, V. Vuiblet, C. Boulagnon-Rombi, M.D. Diebold, C. Pietrement, A.M. Schmidt, P. Rieu, F. Touré. « Signaling of Serum Amyloid A Through Receptor for Advanced Glycation End Products as a Possible Mechanism for Uremia-Related Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2016;36:800-809

Communications orales

Congrès national de la Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA), Biarritz, Juin 2017. *Short communication* : « Chronic kidney disease and arterial thrombosis: implication of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE)? » J. Ortillon et al.

Congrès national de la Société Francophone de Néphrologie, Dialyse et Transplantation (SFNDT), Nice, Octobre 2017. *Short communication* : « Insuffisance rénale chronique et thrombose artérielle : étude de l'implication du vieillissement protéique et du récepteur aux produits de glycation avancée (RAGE) » J. Ortillon et al.

Communications par affiche

Congrès international de « l'American Society of Nephrology » (ASN), La Nouvelle Orléans Octobre 2017. « CKD and arterial thrombosis: role of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) » J. Ortillon et al.

Congrès national de la SFNDT, Nice, Octobre 2017. « Insuffisance rénale chronique et thrombose artérielle : étude de l'implication du vieillissement protéique et du récepteur aux produits de glycation avancée (RAGE) » J. Ortillon et al.

Congrès national de la NSFA, Biarritz, Juin 2017. « Chronic kidney disease and arterial thrombosis: implication of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE)? » J. Ortillon et al.

Congrès national de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMEC), Marseille, mars 2017. « Chronic kidney disease and arterial thrombosis: implication of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)? » J. Ortillon et al.

Journée Jeunes Chercheurs (JJC) de la SFR Cap Santé, Reims, mars 2017. « Chronic kidney disease and arterial thrombosis: implication of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)?» J. Ortillon et *al.*

Journée Jeunes Chercheurs (JJC) de la SFR Cap Santé, Amiens, mars 2016. « Etude de l'implication du Récepteur des produits de glycation avancée (RAGE) dans la formation de thrombose artérielle au cours de l'insuffisance rénale chronique » J. Ortillon et *al.*

Références bibliographiques

- [1] "OMS | Rapport mondial sur le vieillissement et la santé," *WHO*. [Online]. Available: <http://www.who.int/ageing/publications/world-report-2015/fr/>. [Accessed: 07-Aug-2017].
- [2] "Haute Autorité de Santé - Guide parcours de soins maladie rénale chronique de l'adulte." [Online]. Available: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1241102/fr/guide-parcours-de-soins-maladie-renale-chronique-de-l-adulte. [Accessed: 07-Aug-2017].
- [3] A. J. Collins, R. N. Foley, D. T. Gilbertson, and S.-C. Chen, "The State of Chronic Kidney Disease, ESRD, and Morbidity and Mortality in the First Year of Dialysis," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 4, no. Supplement 1, pp. S5–S11, Dec. 2009.
- [4] "Le rapport annuel REIN 2015 - Agence de la biomédecine." [Online]. Available: <https://www.agence-biomedecine.fr/Le-rapport-annuel-REIN-2015-est>. [Accessed: 07-Aug-2017].
- [5] R. L. Dumaine, G. Montalescot, P. G. Steg, E. M. Ohman, K. Eagle, and D. L. Bhatt, "Renal function, atherothrombosis extent, and outcomes in high-risk patients," *Am. Heart J.*, vol. 158, no. 1, pp. 141–148.e1, Jul. 2009.
- [6] J. Blacher, A. P. Guerin, B. Pannier, S. J. Marchais, and G. M. London, "Arterial Calcifications, Arterial Stiffness, and Cardiovascular Risk in End-Stage Renal Disease," *Hypertension*, vol. 38, no. 4, pp. 938–942, Oct. 2001.
- [7] T. Liyanage *et al.*, "Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 385, no. 9981, pp. 1975–1982, May 2015.
- [8] P. S. Parfrey and R. N. Foley, "The Clinical Epidemiology of Cardiac Disease in Chronic Renal Failure," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 10, no. 7, pp. 1606–1615, Jul. 1999.
- [9] R. Vanholder *et al.*, "Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality," *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.*, vol. 20, no. 6, pp. 1048–1056, Jun. 2005.
- [10] J.-F. Toussaint, M.-P. Jacob, L. Lagrost, and J. Chapman, *L'athérosclérose - Physiologie, diagnostics, thérapeutiques*. MASSON, 2003.
- [11] B. E. Sumpio, J. Timothy Riley, and A. Dardik, "Cells in focus: endothelial cell," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 34, no. 12, pp. 1508–1512, Dec. 2002.
- [12] E. A. Jaffe, "Cell biology of endothelial cells," *Hum. Pathol.*, vol. 18, no. 3, pp. 234–239, Mar. 1987.
- [13] J. A. Florian, J. R. Kosky, K. Ainslie, Z. Pang, R. O. Dull, and J. M. Tarbell, "Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Mechanosensor on Endothelial Cells," *Circ. Res.*, vol. 93, no. 10, pp. e136–e142, Nov. 2003.
- [14] K. M. Valentijn, J. E. Sadler, J. A. Valentijn, J. Voorberg, and J. Eikenboom,

"Functional architecture of Weibel-Palade bodies," *Blood*, vol. 117, no. 19, pp. 5033–5043, May 2011.

- [15] E. M. Culav, C. H. Clark, and M. J. Merrilees, "Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy," *Phys. Ther.*, vol. 79, no. 3, pp. 308–319, Mar. 1999.
- [16] S. Ricard-Blum, "The collagen family," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 1, p. a004978, Jan. 2011.
- [17] K. Gelse, E. Pöschl, and T. Aigner, "Collagens--structure, function, and biosynthesis," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 12, pp. 1531–1546, Nov. 2003.
- [18] H. Ps and M. Ej, "Localization of collagen types in regional segments of the fetal bovine aorta," *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 61, no. 5, pp. 548–555, Nov. 1989.
- [19] R. J. Wenstrup, J. B. Florer, E. W. Brunskill, S. M. Bell, I. Chervoneva, and D. E. Birk, "Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 51, pp. 53331–53337, Dec. 2004.
- [20] C. M. Kielty, M. J. Sherratt, and C. A. Shuttleworth, "Elastic fibres," *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. Pt 14, pp. 2817–2828, Jul. 2002.
- [21] J. Uitto, A. M. Christiano, V. M. Kähäri, M. M. Bashir, and J. Rosenbloom, "Molecular biology and pathology of human elastin," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 19, no. 4, pp. 824–829, Nov. 1991.
- [22] M. H. Swee, W. C. Parks, and R. A. Pierce, "Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 25, pp. 14899–14906, Jun. 1995.
- [23] M. J. Fazio *et al.*, "Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 48, no. 4, pp. 696–703, Apr. 1991.
- [24] B. Vrhovski and A. S. Weiss, "Biochemistry of tropoelastin," *Eur. J. Biochem.*, vol. 258, no. 1, pp. 1–18, Nov. 1998.
- [25] B. Li and V. Daggett, "Molecular basis for the extensibility of elastin," *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 23, no. 5–6, pp. 561–573, 2002.
- [26] A. Hinek, "The 67 kDa spliced variant of beta-galactosidase serves as a reusable protective chaperone for tropoelastin," *Ciba Found. Symp.*, vol. 192, pp. 185–191; discussion 191–196, 1995.
- [27] S. Privitera, C. A. Prody, J. W. Callahan, and A. Hinek, "The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 11, pp. 6319–6326, Mar. 1998.

- [28] P. Brown-Augsburger, T. Broekelmann, J. Rosenbloom, and R. P. Mecham, "Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly," *Biochem. J.*, vol. 318 (Pt 1), pp. 149–155, Aug. 1996.
- [29] S. M. Mithieux and A. S. Weiss, "Elastin," *Adv. Protein Chem.*, vol. 70, pp. 437–461, 2005.
- [30] B. Vrhovski, S. Jensen, and A. S. Weiss, "Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin," *Eur. J. Biochem.*, vol. 250, no. 1, pp. 92–98, Nov. 1997.
- [31] A. Hinek, "Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor," *Biol. Chem.*, vol. 377, no. 7–8, pp. 471–480, Aug. 1996.
- [32] D. J. Gottlieb *et al.*, "Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 154, no. 5, pp. 1290–1295, Nov. 1996.
- [33] L. Debelle and A. J. Alix, "The structures of elastins and their function," *Biochimie*, vol. 81, no. 10, pp. 981–994, Oct. 1999.
- [34] C. M. Kielty, T. J. Wess, L. Haston, J. L. Ashworth, M. J. Sherratt, and C. A. Shuttleworth, "Fibrillin-rich microfibrils: elastic biopolymers of the extracellular matrix," *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 23, no. 5–6, pp. 581–596, 2002.
- [35] M. J. Rock *et al.*, "Molecular basis of elastic fiber formation. Critical interactions and a tropoelastin-fibrillin-1 cross-link," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 22, pp. 23748–23758, May 2004.
- [36] A. W. Clarke and A. S. Weiss, "Microfibril-associated glycoprotein-1 binding to tropoelastin: multiple binding sites and the role of divalent cations," *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, no. 14, pp. 3085–3090, Jul. 2004.
- [37] "Color Textbook of Histology - 3rd Edition." [Online]. Available: <https://www.elsevier.com/books/color-textbook-of-histology/gartner/978-1-4160-2945-8>. [Accessed: 12-Jul-2017].
- [38] E. Petersen, F. Wågberg, and K.-A. Angquist, "Serum concentrations of elastin-derived peptides in patients with specific manifestations of atherosclerotic disease," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*, vol. 24, no. 5, pp. 440–444, Nov. 2002.
- [39] T. Fülöp, S. M. Wei, L. Robert, and M. P. Jacob, "Determination of elastin peptides in normal and arteriosclerotic human sera by ELISA," *Clin. Physiol. Biochem.*, vol. 8, no. 6, pp. 273–282, 1990.
- [40] M. Rabinovitch, "EVE and beyond, retro and prospective insights," *Am. J. Physiol.*, vol. 277, no. 1 Pt 1, pp. L5–12, Jul. 1999.
- [41] P. Maurice *et al.*, "Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: The elastokine concept," *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 23, no. 6, pp. 211–221, Aug. 2013.

- [42] R. V. Iozzo and A. D. Murdoch, "Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 10, no. 5, pp. 598–614, Apr. 1996.
- [43] K. Prydz and K. T. Dalen, "Synthesis and sorting of proteoglycans," *J. Cell Sci.*, vol. 113 Pt 2, pp. 193–205, Jan. 2000.
- [44] J. H. Yoon and J. Halper, "Tendon proteoglycans: biochemistry and function," *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, vol. 5, no. 1, pp. 22–34, Mar. 2005.
- [45] Q. Chen *et al.*, "Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 36, pp. 26418–26430, Sep. 2007.
- [46] R. V. Iozzo, "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 67, pp. 609–652, 1998.
- [47] M.-P. Jacob, "[Extracellular matrix and vascular ageing]," *Med. Sci. MS*, vol. 22, no. 3, pp. 273–278, Mar. 2006.
- [48] L. A. Fitzpatrick, A. Severson, W. D. Edwards, and R. T. Ingram, "Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis," *J. Clin. Invest.*, vol. 94, no. 4, pp. 1597–1604, Oct. 1994.
- [49] A. S. Pai and C. M. Giachelli, "Matrix remodeling in vascular calcification associated with chronic kidney disease," *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 21, no. 10, pp. 1637–1640, Oct. 2010.
- [50] S. M. Moe and N. X. Chen, "Mechanisms of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 19, no. 2, pp. 213–216, Feb. 2008.
- [51] S. Jono, A. Shioi, Y. Ikari, and Y. Nishizawa, "Vascular calcification in chronic kidney disease," *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 24, no. 2, pp. 176–181, Mar. 2006.
- [52] H. C. Stary *et al.*, "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 15, no. 9, pp. 1512–1531, Sep. 1995.
- [53] T. Tsukada, M. Rosenfeld, R. Ross, and A. M. Gown, "Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit," *Arterioscler. Dallas Tex*, vol. 6, no. 6, pp. 601–613, Dec. 1986.
- [54] A. P. Burke *et al.*, "Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression," *Circulation*, vol. 103, no. 7, pp. 934–940, Feb. 2001.
- [55] A. M. Malek, S. L. Alper, and S. Izumo, "Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis," *JAMA*, vol. 282, no. 21, pp. 2035–2042, Dec. 1999.

- [56] H. Jo, R. O. Dull, T. M. Hollis, and J. M. Tarbell, "Endothelial albumin permeability is shear dependent, time dependent, and reversible," *Am. J. Physiol.*, vol. 260, no. 6 Pt 2, pp. H1992–1996, Jun. 1991.
- [57] Y. S. Chatzizisis, A. U. Coskun, M. Jonas, E. R. Edelman, C. L. Feldman, and P. H. Stone, "Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 49, no. 25, pp. 2379–2393, Jun. 2007.
- [58] P. F. Davies, M. Civelek, Y. Fang, and I. Fleming, "The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo," *Cardiovasc. Res.*, vol. 99, no. 2, pp. 315–327, Jul. 2013.
- [59] J. Frueh *et al.*, "Systems biology of the functional and dysfunctional endothelium," *Cardiovasc. Res.*, vol. 99, no. 2, pp. 334–341, Jul. 2013.
- [60] M. Viola *et al.*, "Extracellular Matrix in Atherosclerosis: Hyaluronan and Proteoglycans Insights," *Curr. Med. Chem.*, vol. 23, no. 26, pp. 2958–2971, 2016.
- [61] E. Hurt, G. Bondjers, and G. Camejo, "Interaction of LDL with human arterial proteoglycans stimulates its uptake by human monocyte-derived macrophages," *J. Lipid Res.*, vol. 31, no. 3, pp. 443–454, Mar. 1990.
- [62] J. L. Witztum and D. Steinberg, "Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis," *J. Clin. Invest.*, vol. 88, no. 6, pp. 1785–1792, Dec. 1991.
- [63] G. M. Chisolm, S. L. Hazen, P. L. Fox, and M. K. Cathcart, "The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 37, pp. 25959–25962, Sep. 1999.
- [64] K. D. O'Brien *et al.*, "Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis," *J. Clin. Invest.*, vol. 92, no. 2, pp. 945–951, Aug. 1993.
- [65] Z. M. Dong, S. M. Chapman, A. A. Brown, P. S. Frenette, R. O. Hynes, and D. D. Wagner, "The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis," *J. Clin. Invest.*, vol. 102, no. 1, pp. 145–152, Jul. 1998.
- [66] P. Libby, "Changing concepts of atherogenesis," *J. Intern. Med.*, vol. 247, no. 3, pp. 349–358, Mar. 2000.
- [67] M. P. de Winther and M. H. Hofker, "Scavenging new insights into atherogenesis," *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 8, pp. 1039–1041, Apr. 2000.
- [68] M. P. de Winther, K. W. van Dijk, L. M. Havekes, and M. H. Hofker, "Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 20, no. 2, pp. 290–297, Feb. 2000.
- [69] P. Tontonoz, L. Nagy, J. G. Alvarez, V. A. Thomazy, and R. M. Evans, "PPARgamma

promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL," *Cell*, vol. 93, no. 2, pp. 241–252, Apr. 1998.

[70] S. Allahverdian, A. C. Chehroudi, B. M. McManus, T. Abraham, and G. A. Francis, "Contribution of Intimal Smooth Muscle Cells to Cholesterol Accumulation and Macrophage-Like Cells in Human Atherosclerosis," *Circulation*, vol. 129, no. 15, pp. 1551–1559, Apr. 2014.

[71] S. Feil *et al.*, "Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells to Macrophage-Like Cells During Atherogenesis," *Circ. Res.*, vol. 115, no. 7, pp. 662–667, Sep. 2014.

[72] A. C. Doran, N. Meller, and C. A. McNamara, "The Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 5, pp. 812–819, May 2008.

[73] G. K. Owens, M. S. Kumar, and B. R. Wamhoff, "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease," *Physiol. Rev.*, vol. 84, no. 3, pp. 767–801, Jul. 2004.

[74] S. Glagov, E. Weisenberg, C. K. Zarins, R. Stankunavicius, and G. J. Kolettis, "Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries," *N. Engl. J. Med.*, vol. 316, no. 22, pp. 1371–1375, May 1987.

[75] J. S. Choy *et al.*, "Compensatory Enlargement of Ossabaw Miniature Swine Coronary Arteries in Diffuse Atherosclerosis," *IJC Heart Vasc.*, vol. 6, pp. 4–11, Mar. 2015.

[76] V. Fuster, P. R. Moreno, Z. A. Fayad, R. Corti, and J. J. Badimon, "Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 46, no. 6, pp. 937–954, Sep. 2005.

[77] A. C. van der Wal, A. E. Becker, C. M. van der Loos, and P. K. Das, "Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology," *Circulation*, vol. 89, no. 1, pp. 36–44, Jan. 1994.

[78] F. D. Kolodgie *et al.*, "The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes," *Curr. Opin. Cardiol.*, vol. 16, no. 5, pp. 285–292, Sep. 2001.

[79] Z. S. Galis, G. K. Sukhova, M. W. Lark, and P. Libby, "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques," *J. Clin. Invest.*, vol. 94, no. 6, pp. 2493–2503, Dec. 1994.

[80] G. K. Sukhova, G. P. Shi, D. I. Simon, H. A. Chapman, and P. Libby, "Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells," *J. Clin. Invest.*, vol. 102, no. 3, pp. 576–583, Aug. 1998.

[81] P. J. Gough, I. G. Gomez, P. T. Wille, and E. W. Raines, "Macrophage expression of

active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 1, pp. 59–69, Jan. 2006.

[82] A. C. Newby, "Metalloproteinases promote plaque rupture and myocardial infarction: A persuasive concept waiting for clinical translation," *Matrix Biol.*, vol. 44–46, pp. 157–166, May 2015.

[83] L. Badimon and G. Vilahur, "Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture," *J. Intern. Med.*, vol. 276, no. 6, pp. 618–632, Dec. 2014.

[84] M. B. Taubman *et al.*, "Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis," *Thromb. Haemost.*, vol. 78, no. 1, pp. 200–204, Jul. 1997.

[85] A. S. Leroyer *et al.*, "Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 49, no. 7, pp. 772–777, Feb. 2007.

[86] A. Fernández-Ortiz *et al.*, "Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 23, no. 7, pp. 1562–1569, Jun. 1994.

[87] K. Tatsumi and N. Mackman, "Tissue Factor and Atherothrombosis," *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 22, no. 6, pp. 543–549, 2015.

[88] P. Gresele, V. Fuster, J. A. Lopez, C. P. Page, and J. Vermylen, *Platelets in Hematologic and Cardiovascular Disorders: A Clinical Handbook*. Cambridge University Press, 2007.

[89] J. D. Marmur *et al.*, "Identification of active tissue factor in human coronary atheroma," *Circulation*, vol. 94, no. 6, pp. 1226–1232, Sep. 1996.

[90] Z. Mallat, B. Hugel, J. Ohan, G. Lesèche, J. M. Freyssinet, and A. Tedgui, "Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity," *Circulation*, vol. 99, no. 3, pp. 348–353, Jan. 1999.

[91] A. D. Michelson, *Platelets*. Academic Press, 2011.

[92] P. Harrison, "Platelet function analysis," *Blood Rev.*, vol. 19, no. 2, pp. 111–123, Mar. 2005.

[93] J. N. George, "Platelets," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 355, no. 9214, pp. 1531–1539, Apr. 2000.

[94] J. E. Fox, "Cytoskeletal proteins and platelet signaling," *Thromb. Haemost.*, vol. 86, no. 1, pp. 198–213, Jul. 2001.

[95] P. Blair and R. Flaumenhaft, "Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates," *Blood Rev.*, vol. 23, no. 4, pp. 177–189, Jul. 2009.

- [96] R. K. Andrews, J. A. López, and M. C. Berndt, "Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 29, no. 1, pp. 91–105, Jan. 1997.
- [97] P. André *et al.*, "Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins," *Blood*, vol. 96, no. 10, pp. 3322–3328, Nov. 2000.
- [98] M. Moroi, S. M. Jung, K. Shinmyozu, Y. Tomiyama, A. Ordinas, and M. Diaz-Ricart, "Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion," *Blood*, vol. 88, no. 6, pp. 2081–2092, Sep. 1996.
- [99] S. Massberg *et al.*, "A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo," *J. Exp. Med.*, vol. 197, no. 1, pp. 41–49, Jan. 2003.
- [100] B. Nieswandt *et al.*, "Glycoprotein VI but not alpha₂beta₁ integrin is essential for platelet interaction with collagen," *EMBO J.*, vol. 20, no. 9, pp. 2120–2130, May 2001.
- [101] A. Kasirer-Friede, J. Ware, L. Leng, P. Marchese, Z. M. Ruggeri, and S. J. Shattil, "Lateral clustering of platelet GP Ib-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of integrin alpha IIbbeta 3," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 14, pp. 11949–11956, Apr. 2002.
- [102] S. R. Steinhubl and D. J. Moliterno, "The Role of the Platelet in the Pathogenesis of Atherothrombosis," *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, vol. 5, no. 6, pp. 399–408, Nov. 2005.
- [103] C. Gachet, "P2 receptors, platelet function and pharmacological implications," *Thromb. Haemost.*, vol. 99, no. 3, pp. 466–472, Mar. 2008.
- [104] P. Jungers, Z. Oualim, T. Nguyen-Khoa, Z. Massy, and G. London, *La cardioprotection: une composante essentielle du traitement de l'insuffisance rénale chronique dès le stade prédiyalytique*. 2017.
- [105] A. Guerin, S. Marchais, B. Pannier, and G. London, "Anomalies cardiaques chez l'insuffisant rénal chronique," *Presse Médicale*, vol. 29, no. 5, pp. 274–280, 2000.
- [106] C. Zoccali *et al.*, "Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients," *Kidney Int.*, vol. 62, no. 1, pp. 339–345, Jul. 2002.
- [107] G. M. London, "Cardiovascular disease in chronic renal failure: pathophysiologic aspects," *Semin. Dial.*, vol. 16, no. 2, pp. 85–94, Apr. 2003.
- [108] T. B. Drüeke and Z. A. Massy, "Atherosclerosis in CKD: differences from the general population," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 6, no. 12, pp. 723–735, Dec. 2010.
- [109] T. Nakano *et al.*, "Association of Kidney Function With Coronary Atherosclerosis and Calcification in Autopsy Samples From Japanese Elders: The Hisayama Study," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 55, no. 1, pp. 21–30, Jan. 2010.

- [110] G. M. London and T. B. Drueke, "Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure," *Kidney Int.*, vol. 51, no. 6, pp. 1678–1695, Jun. 1997.
- [111] P. Jungers *et al.*, "Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study," *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.*, vol. 12, no. 12, pp. 2597–2602, Dec. 1997.
- [112] M. Koch *et al.*, "Apolipoprotein B, fibrinogen, HDL cholesterol, and apolipoprotein(a) phenotypes predict coronary artery disease in hemodialysis patients," *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 8, no. 12, pp. 1889–1898, Dec. 1997.
- [113] P. W. Wilson *et al.*, "Cumulative effects of high cholesterol levels, high blood pressure, and cigarette smoking on carotid stenosis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 337, no. 8, pp. 516–522, Aug. 1997.
- [114] R. J. Perry, W. Griffiths, P. Dextraze, R. J. Solomon, and W. M. Trebbin, "Elevated nicotine levels in patients undergoing hemodialysis: A role in cardiovascular mortality and morbidity?," *Am. J. Med.*, vol. 76, no. 2, pp. 241–246, Feb. 1984.
- [115] R. N. Foley *et al.*, "Cardiac disease in diabetic end-stage renal disease," *Diabetologia*, vol. 40, no. 11, pp. 1307–1312, Nov. 1997.
- [116] A. P. Guérin, G. M. London, S. J. Marchais, and F. Metivier, "Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease," *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.*, vol. 15, no. 7, pp. 1014–1021, Jul. 2000.
- [117] T. Nguyen-Khoa *et al.*, "Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment," *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.*, vol. 16, no. 2, pp. 335–340, Feb. 2001.
- [118] J. Zimmermann, S. Herrlinger, A. Pruy, T. Metzger, and C. Wanner, "Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients," *Kidney Int.*, vol. 55, no. 2, pp. 648–658, Feb. 1999.
- [119] Z. A. Massy, P. Stenvinkel, and T. B. Drueke, "The Role of Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease," *Semin. Dial.*, vol. 22, no. 4, pp. 405–408, Jul. 2009.
- [120] P. Jungers, N. K. Man, D. Joly, and C. Legendre, *L'insuffisance rénale chronique : prévention et traitement*. Lavoisier, 2011.
- [121] P. L. Gross and W. C. Aird, "The endothelium and thrombosis," *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 26, no. 5, pp. 463–478, 2000.
- [122] D. Fliser *et al.*, "The dysfunctional endothelium in CKD and in cardiovascular disease: mapping the origin(s) of cardiovascular problems in CKD and of kidney disease in cardiovascular conditions for a research agenda," *Kidney Int. Suppl.*, vol. 1, no. 1, pp. 6–9, Jun. 2011.

- [123] N. Jourde-Chiche, L. Dou, C. Cerini, F. Dignat-George, and P. Brunet, "Vascular Incompetence in Dialysis Patients—Protein-Bound Uremic Toxins and Endothelial Dysfunction," *Semin. Dial.*, vol. 24, no. 3, pp. 327–337, May 2011.
- [124] W. E. Moody *et al.*, "Endothelial dysfunction and cardiovascular disease in early-stage chronic kidney disease: cause or association?," *Atherosclerosis*, vol. 223, no. 1, pp. 86–94, Jul. 2012.
- [125] M. Takagi *et al.*, "Increased vascular endothelial cell markers in patients with chronic renal failure on maintenance haemodialysis," *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.*, vol. 5, no. 5, pp. 713–717, Oct. 1994.
- [126] M. Bonomini, M. Reale, P. Santarelli, S. Stuard, N. Settefrati, and A. Albertazzi, "Serum levels of soluble adhesion molecules in chronic renal failure and dialysis patients," *Nephron*, vol. 79, no. 4, pp. 399–407, Aug. 1998.
- [127] F. Sabatier, L. Camoin-Jau, F. Anfosso, J. Sampol, and F. Dignat-George, "Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 3, pp. 454–471, Mar. 2009.
- [128] I. Dursun *et al.*, "The relationship between circulating endothelial microparticles and arterial stiffness and atherosclerosis in children with chronic kidney disease," *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.*, vol. 24, no. 8, pp. 2511–2518, Aug. 2009.
- [129] C. Gao *et al.*, "Thrombotic Role of Blood and Endothelial Cells in Uremia through Phosphatidylserine Exposure and Microparticle Release," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 11, Nov. 2015.
- [130] N. Jourde-Chiche *et al.*, "Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 7, no. 9, pp. 1576–1584, Sep. 2009.
- [131] M. E. Suliman and P. Stenvinkel, "Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients," *Saudi J. Kidney Dis. Transplant. Off. Publ. Saudi Cent. Organ Transplant. Saudi Arab.*, vol. 19, no. 3, pp. 329–345, May 2008.
- [132] R. Jofré, P. Rodriguez-Benitez, J. M. López-Gómez, and R. Pérez-Garcia, "Inflammatory Syndrome in Patients on Hemodialysis," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, no. 12 suppl 3, pp. S274–S280, Dec. 2006.
- [133] J.-J. Li and C.-H. Fang, "C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases," *Med. Hypotheses*, vol. 62, no. 4, pp. 499–506, Apr. 2004.
- [134] B. A. Lavín-Gómez *et al.*, "Inflammation markers, chronic kidney disease, and renal replacement therapy," *Adv. Perit. Dial. Conf. Perit. Dial.*, vol. 27, pp. 33–37, 2011.
- [135] T. Weichhart *et al.*, "Serum amyloid A in uremic HDL promotes inflammation," *J.*

Am. Soc. Nephrol. JASN, vol. 23, no. 5, pp. 934–947, May 2012.

- [136] P. Stenvinkel *et al.*, “IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia—The good, the bad, and the ugly,” *Kidney Int.*, vol. 67, no. 4, pp. 1216–1233, Apr. 2005.
- [137] B. J. Pereira, L. Shapiro, A. J. King, M. E. Falagas, J. A. Strom, and C. A. Dinarello, “Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients,” *Kidney Int.*, vol. 45, no. 3, pp. 890–896, Mar. 1994.
- [138] J. Lutz, J. Menke, D. Sollinger, H. Schinzel, and K. Thürmel, “Haemostasis in chronic kidney disease,” *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.*, vol. 29, no. 1, pp. 29–40, Jan. 2014.
- [139] M. Bonomini, S. Dottori, L. Amoroso, A. Arduini, and V. Sirolli, “Increased platelet phosphatidylserine exposure and caspase activation in chronic uremia,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 2, no. 8, pp. 1275–1281, Aug. 2004.
- [140] T. M. C. Brunini, A. C. Mendes-Ribeiro, J. C. Ellory, and G. E. Mann, “Platelet nitric oxide synthesis in uremia and malnutrition: A role for l-arginine supplementation in vascular protection?,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 73, no. 2, pp. 359–367, Jan. 2007.
- [141] K. Yang *et al.*, “Indoxyl sulfate induces platelet hyperactivity and contributes to chronic kidney disease-associated thrombosis in mice,” *Blood*, vol. 129, no. 19, pp. 2667–2679, May 2017.
- [142] D. Zhu, N. C. W. Mackenzie, C. Farquharson, and V. E. MacRae, “Mechanisms and Clinical Consequences of Vascular Calcification,” *Front. Endocrinol.*, vol. 3, Aug. 2012.
- [143] H. C. Stary, “Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression,” *Z. Kardiol.*, vol. 89 Suppl 2, pp. 28–35, 2000.
- [144] C. M. Shanahan, N. R. Cary, J. R. Salisbury, D. Proudfoot, P. L. Weissberg, and M. E. Edmonds, “Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg’s sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification,” *Circulation*, vol. 100, no. 21, pp. 2168–2176, Nov. 1999.
- [145] B. P. Mwipatayi, C. Cooke, R. H. Sinniah, M. Abbas, D. Angel, and K. Sieunarine, “Calciphylaxis: emerging concept in vascular patients,” *Eur. J. Dermatol. EJD*, vol. 17, no. 1, pp. 73–78, Feb. 2007.
- [146] G. Perceau, “L’artériopathie calcifiante urémique et non urémique : urgence diagnostique et thérapeutique,” *Ann. Dermatol. Vénéréologie*, vol. 142, no. 8, pp. 506–512, Aug. 2015.
- [147] M. Ketteler *et al.*, “Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 361, no. 9360, pp. 827–833, Mar. 2003.

- [148] M. Y. Speer *et al.*, "Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo," *J. Exp. Med.*, vol. 196, no. 8, pp. 1047–1055, Oct. 2002.
- [149] D. Proudfoot, J. N. Skepper, L. Hegyi, M. R. Bennett, C. M. Shanahan, and P. L. Weissberg, "Apoptosis Regulates Human Vascular Calcification In Vitro," *Circ. Res.*, vol. 87, no. 11, pp. 1055–1062, Nov. 2000.
- [150] D. Proudfoot, J. N. Skepper, L. Hegyi, M. R. Bennett, C. M. Shanahan, and P. L. Weissberg, "Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies," *Circ. Res.*, vol. 87, no. 11, pp. 1055–1062, Nov. 2000.
- [151] J. L. Reynolds *et al.*, "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*, vol. 15, no. 11, pp. 2857–2867, Nov. 2004.
- [152] M. Y. Speer and C. M. Giachelli, "Regulation of cardiovascular calcification," *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, vol. 13, no. 2, pp. 63–70, Apr. 2004.
- [153] J.-S. Shao, S.-L. Cheng, J. M. Pingsterhaus, N. Charlton-Kachigian, A. P. Loewy, and D. A. Towler, "Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 5, pp. 1210–1220, May 2005.
- [154] B. Lee *et al.*, "Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia," *Nat. Genet.*, vol. 16, no. 3, pp. 307–310, Jul. 1997.
- [155] X. Li, H.-Y. Yang, and C. M. Giachelli, "Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification," *Circ. Res.*, vol. 98, no. 7, pp. 905–912, Apr. 2006.
- [156] N. X. Chen *et al.*, "The mechanisms of uremic serum-induced expression of bone matrix proteins in bovine vascular smooth muscle cells," *Kidney Int.*, vol. 70, no. 6, pp. 1046–1053, Sep. 2006.
- [157] M. Murshed, D. Harmey, J. L. Millán, M. D. McKee, and G. Karsenty, "Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone," *Genes Dev.*, vol. 19, no. 9, pp. 1093–1104, May 2005.
- [158] M. Bailey, S. Pillarisetti, P. Jones, H. Xiao, D. Simionescu, and N. Vyawahare, "Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification," *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, vol. 13, no. 3, pp. 146–155, Jun. 2004.
- [159] A. M. Schmidt *et al.*, "Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the

endothelial cell surface," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 21, pp. 14987–14997, Jul. 1992.

[160] T. Chavakis *et al.*, "The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment," *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 10, pp. 1507–1515, Nov. 2003.

[161] S. Ghavami *et al.*, "S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 83, no. 6, pp. 1484–1492, Jun. 2008.

[162] M. A. Hofmann *et al.*, "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides," *Cell*, vol. 97, no. 7, pp. 889–901, Jun. 1999.

[163] O. Hori *et al.*, "The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 43, pp. 25752–25761, Oct. 1995.

[164] S. D. Yan *et al.*, "RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease," *Nature*, vol. 382, no. 6593, pp. 685–691, Aug. 1996.

[165] V. Rai *et al.*, "Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling," *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 13, pp. 2339–2350, Dec. 2012.

[166] J. Brett *et al.*, "Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues," *Am. J. Pathol.*, vol. 143, no. 6, pp. 1699–1712, Dec. 1993.

[167] N. Demling, C. Ehrhardt, M. Kasper, M. Laue, L. Knels, and E. P. Rieber, "Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells," *Cell Tissue Res.*, vol. 323, no. 3, pp. 475–488, Mar. 2006.

[168] K. S. Collison *et al.*, "RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs)," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 71, no. 3, pp. 433–444, Mar. 2002.

[169] T. Gawlowski *et al.*, "Advanced glycation end products strongly activate platelets," *Eur. J. Nutr.*, vol. 48, no. 8, pp. 475–481, Dec. 2009.

[170] N. Tanji *et al.*, "Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease," *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 11, no. 9, pp. 1656–1666, Sep. 2000.

[171] E. Harja *et al.*, "Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE-/- mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 1, pp. 183–194, Jan. 2008.

- [172] A. Taguchi *et al.*, “Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases,” *Nature*, vol. 405, no. 6784, pp. 354–360, May 2000.
- [173] S. S. Yan *et al.*, “Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system,” *Nat. Med.*, vol. 9, no. 3, pp. 287–293, Mar. 2003.
- [174] R. Deane *et al.*, “RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain,” *Nat. Med.*, vol. 9, no. 7, pp. 907–913, Jul. 2003.
- [175] L.-C. Maillard, “Action des acides aminés sur les sucres ; formation des mélanoïdes par voie méthodique.,” vol. 154, pp. 66–8, 1912.
- [176] E. Boulanger, F. Puisieux, C. Gaxatte, and J.-L. Wautier, “Vieillissement: rôle et contrôle de la glycation,” *Rev. Médecine Interne*, vol. 28, no. 12, pp. 832–840, Dec. 2007.
- [177] E. Boulanger, P. Dequiedt, and J.-L. Wautier, “Les produits de glycation avancée (AGE): de nouvelles toxines?,” *Néphrologie*, vol. 23, no. 7, pp. 351–359, 2002.
- [178] T. Miyata *et al.*, “Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure,” *Kidney Int.*, vol. 51, no. 4, pp. 1170–1181, Apr. 1997.
- [179] P. J. Thornalley, “Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 31, no. Pt 6, pp. 1343–1348, Dec. 2003.
- [180] R. Inagi, “RAGE and glyoxalase in kidney disease,” *Glycoconj. J.*, vol. 33, no. 4, pp. 619–626, Aug. 2016.
- [181] S.-F. Yan, X. Shen, R. Rosario, and A. M. Schmidt, “RAGE-dependent Down-regulation of Glyoxalase-1 Impairs Inflammatory Response and Angiogenesis in Hind Limb Ischemia in Diabetic Mice,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 35, no. Suppl 1, pp. A512–A512, May 2015.
- [182] D. B. Zimmer, E. H. Cornwall, A. Landar, and W. Song, “The S100 protein family: History, function, and expression,” *Brain Res. Bull.*, vol. 37, no. 4, pp. 417–429, Jan. 1995.
- [183] C. W. Heizmann and J. A. Cox, “New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca²⁺ -, Zn²⁺ - and Cu²⁺ -binding protein family,” *Biometals*, vol. 11, no. 4, pp. 383–397, Dec. 1998.
- [184] C. W. Heizmann, G. Fritz, and B. W. Schäfer, “S100 proteins: structure, functions and pathology,” *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 7, pp. d1356–1368, May 2002.
- [185] M. A. Hofmann *et al.*, “RAGE Mediates a Novel Proinflammatory Axis,” *Cell*, vol. 97, no. 7, pp. 889–901, Jun. 1999.

- [186] C. Poitou, A. Divoux, and K. Clément, “La sérum amyloïde A : une apolipoprotéine majeure de l’inflammation,” *Sang Thromb. Vaiss.*, vol. 20, no. 7, pp. 362–368, Jul. 2008.
- [187] A. Kontush and M. J. Chapman, “Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 58, no. 3, pp. 342–374, Sep. 2006.
- [188] J. R. Delanghe *et al.*, “Discriminative value of serum amyloid A and other acute-phase proteins for coronary heart disease,” *Atherosclerosis*, vol. 160, no. 2, pp. 471–476, Feb. 2002.
- [189] K. D. O’Brien *et al.*, “Serum Amyloid A and Lipoprotein Retention in Murine Models of Atherosclerosis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 4, pp. 785–790, Apr. 2005.
- [190] S. D. Yan *et al.*, “Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis,” *Nat. Med.*, vol. 6, no. 6, pp. 643–651, Jun. 2000.
- [191] M. T. Lotze and K. J. Tracey, “High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 4, pp. 331–342, Apr. 2005.
- [192] T. Bonaldi *et al.*, “Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion,” *EMBO J.*, vol. 22, no. 20, pp. 5551–5560, Oct. 2003.
- [193] S. Gardella *et al.*, “The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway,” *EMBO Rep.*, vol. 3, no. 10, pp. 995–1001, Oct. 2002.
- [194] P. Rovere-Querini *et al.*, “HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells,” *EMBO Rep.*, vol. 5, no. 8, pp. 825–830, Aug. 2004.
- [195] “HMGB1 SIGNALS THROUGH TOLL-LIKE RECEPTOR (TLR) 4 AND TLR2 : Shock,” *LWW*. [Online]. Available: http://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2006/08000/HMGB1_SIGNALS_THROUGH_TOLL_LIKE_RECECTOR_TLR_4.11.aspx. [Accessed: 03-Aug-2017].
- [196] R. Kokkola *et al.*, “RAGE is the Major Receptor for the Proinflammatory Activity of HMGB1 in Rodent Macrophages,” *Scand. J. Immunol.*, vol. 61, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2005.
- [197] A. Goury *et al.*, “Deletion of receptor for advanced glycation end products exacerbates lymphoproliferative syndrome and lupus nephritis in B6-MRL Fas lpr/j mice,” *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 194, no. 8, pp. 3612–3622, Apr. 2015.
- [198] M. Nepper *et al.*, “Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 21, pp. 14998–15004, Jul. 1992.
- [199] T. Kislinger *et al.*, “N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling

pathways and modulate gene expression," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 44, pp. 31740–31749, Oct. 1999.

[200] B. M. Dattilo, G. Fritz, E. Leclerc, C. W. V. Kooi, C. W. Heizmann, and W. J. Chazin, "The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 46, no. 23, pp. 6957–6970, Jun. 2007.

[201] M. Koch *et al.*, "Structural Basis for Ligand Recognition and Activation of RAGE," *Structure*, vol. 18, no. 10, pp. 1342–1352, Oct. 2010.

[202] A. M. Schmidt, S. D. Yan, S. F. Yan, and D. M. Stern, "The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses," *J. Clin. Invest.*, vol. 108, no. 7, pp. 949–955, Oct. 2001.

[203] G. Fritz, "RAGE: a single receptor fits multiple ligands," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 36, no. 12, pp. 625–632, Dec. 2011.

[204] J. Xie, S. Reverdatto, A. Frolov, R. Hoffmann, D. S. Burz, and A. Shekhtman, "Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE)," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 40, pp. 27255–27269, Oct. 2008.

[205] J. Xue *et al.*, "Advanced glycation end product recognition by the receptor for AGEs," *Struct. Lond. Engl.* 1993, vol. 19, no. 5, pp. 722–732, May 2011.

[206] G. Basta, "Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications," *Atherosclerosis*, vol. 196, no. 1, pp. 9–21, Jan. 2008.

[207] H. Vissing, L. Aagaard, N. Tommerup, and E. Boel, "Localization of the human gene for advanced glycosylation end product-specific receptor (AGER) to chromosome 6p21.3," *Genomics*, vol. 24, no. 3, pp. 606–608, Dec. 1994.

[208] T. Spies, M. Bresnahan, and J. L. Strominger, "Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 86, no. 22, pp. 8955–8958, Nov. 1989.

[209] J. Li and A. M. Schmidt, "Characterization and Functional Analysis of the Promoter of RAGE, the Receptor for Advanced Glycation End Products," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 26, pp. 16498–16506, Jun. 1997.

[210] K. Kierdorf and G. Fritz, "RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 94, no. 1, pp. 55–68, Jul. 2013.

[211] P. Schraml, I. Bendik, and C. U. Ludwig, "Differential Messenger RNA and Protein Expression of the Receptor for Advanced Glycosylated End Products in Normal Lung and Non-Small Cell Lung Carcinoma," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 17, pp. 3669–3671, Sep. 1997.

[212] E. Fuentes, I. Palomo, and A. Rojas, "Cross-talk between platelet and tumor

microenvironment: Role of multiligand/RAGE axis in platelet activation," *Blood Rev.*, Dec. 2015.

[213] A. Rojas, H. Figueroa, and E. Morales, "Fueling inflammation at tumor microenvironment: the role of multiligand/RAGE axis," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 3, pp. 334–341, Mar. 2010.

[214] B. I. Hudson *et al.*, "Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 22, no. 5, pp. 1572–1580, May 2008.

[215] A. Z. Kalea, N. Reiniger, H. Yang, M. Arriero, A. M. Schmidt, and B. I. Hudson, "Alternative splicing of the murine receptor for advanced glycation end-products (RAGE) gene," *FASEB J.*, vol. 23, no. 6, pp. 1766–1774, Jun. 2009.

[216] G. Srikrishna *et al.*, "Carboxylated N-glycans on RAGE promote S100A12 binding and signaling," *J. Cell. Biochem.*, vol. 110, no. 3, pp. 645–659, Jun. 2010.

[217] S. J. Park, T. Kleffmann, and P. A. Hessian, "The G82S Polymorphism Promotes Glycosylation of the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) at Asparagine 81 COMPARISON OF WILD-TYPE RAGE WITH THE G82S POLYMORPHIC VARIANT," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 24, pp. 21384–21392, Jun. 2011.

[218] L. Zhang *et al.*, "Receptor for Advanced Glycation End Products Is Subjected to Protein Ectodomain Shedding by Metalloproteinases," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 51, pp. 35507–35516, Dec. 2008.

[219] A. Raucci *et al.*, "A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10)," *FASEB J.*, vol. 22, no. 10, pp. 3716–3727, Oct. 2008.

[220] A. Galichet, M. Weibel, and C. W. Heizmann, "Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 370, no. 1, pp. 1–5, May 2008.

[221] V. V. Metz, E. Kojro, D. Rat, and R. Postina, "Induction of RAGE Shedding by Activation of G Protein-Coupled Receptors," *PLOS ONE*, vol. 7, no. 7, p. e41823, juil 2012.

[222] V. Rai, A. Y. Maldonado, D. S. Burz, S. Reverdatto, A. M. Schmidt, and A. Shekhtman, "Signal Transduction in Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) SOLUTION STRUCTURE OF C-TERMINAL RAGE (ctRAGE) AND ITS BINDING TO mDia1," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 7, pp. 5133–5144, Feb. 2012.

[223] B. I. Hudson *et al.*, "Interaction of the RAGE Cytoplasmic Domain with Diaphanous-1 Is Required for Ligand-stimulated Cellular Migration through Activation of Rac1 and Cdc42," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 49, pp. 34457–34468, Dec. 2008.

[224] P. L. Hordijk, "Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins," *Circ. Res.*, vol. 98, no. 4, pp. 453–462, Mar. 2006.

- [225] M.-P. Wautier, O. Chappey, S. Corda, D. M. Stern, A. M. Schmidt, and J.-L. Wautier, "Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE," *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 280, no. 5, pp. E685–E694, May 2001.
- [226] Z. J. Guo *et al.*, "Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, no. 10, pp. 1699–1712, Oct. 2008.
- [227] T. Tominaga, E. Sahai, P. Chardin, F. McCormick, S. A. Courtneidge, and A. S. Alberts, "Diaphanous-Related Formins Bridge Rho GTPase and Src Tyrosine Kinase Signaling," *Mol. Cell*, vol. 5, no. 1, pp. 13–25, Jan. 2000.
- [228] R. Bianchi, E. Kastrisianaki, I. Giambanco, and R. Donato, "S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 9, pp. 7214–7226, Mar. 2011.
- [229] M. A. Reddy *et al.*, "Key Role of Src Kinase in S100B-induced Activation of the Receptor for Advanced Glycation End Products in Vascular Smooth Muscle Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 19, pp. 13685–13693, May 2006.
- [230] M. Sakaguchi *et al.*, "TIRAP, an Adaptor Protein for TLR2/4, Transduces a Signal from RAGE Phosphorylated upon Ligand Binding," *PLOS ONE*, vol. 6, no. 8, p. e23132, août 2011.
- [231] H. M. Lander, J. M. Tauras, J. S. Ogiste, O. Hori, R. A. Moss, and A. M. Schmidt, "Activation of the Receptor for Advanced Glycation End Products Triggers a p21 ras -dependent Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Regulated by Oxidant Stress," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 28, pp. 17810–17814, Jul. 1997.
- [232] A. M. Cortizo, M. G. Lettieri, D. A. Barrio, N. Mercer, S. B. Etcheverry, and A. D. McCarthy, "Advanced glycation end-products (AGEs) induce concerted changes in the osteoblastic expression of their receptor RAGE and in the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK)," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 250, no. 1–2, pp. 1–10, Aug. 2003.
- [233] N. Shanmugam, Y. S. Kim, L. Lanting, and R. Natarajan, "Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression in Monocytes by Ligation of the Receptor for Advanced Glycation End Products," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 37, pp. 34834–34844, Sep. 2003.
- [234] K. Ishihara, K. Tsutsumi, S. Kawane, M. Nakajima, and T. Kasaoka, "The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site," *FEBS Lett.*, vol. 550, no. 1–3, pp. 107–113, Aug. 2003.
- [235] K. Inoue *et al.*, "HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques," *Cardiovasc. Pathol.*, vol. 16, no. 3, pp. 136–143, May 2007.
- [236] D. P. Barlovic, A. Soro-Paavonen, and K. A. M. Jandeleit-Dahm, "RAGE biology, atherosclerosis and diabetes," *Clin. Sci.*, vol. 121, no. 2, pp. 43–55, Jul. 2011.

- [237] I. Eue, C. Langer, A. Eckardstein, and C. Sorg, "Myeloid related protein (MRP) 14 expressing monocytes infiltrate atherosclerotic lesions of ApoE null mice," *Atherosclerosis*, vol. 151, no. 2, pp. 593–597, Aug. 2000.
- [238] F. Cipollone *et al.*, "The Receptor RAGE as a Progression Factor Amplifying Arachidonate-Dependent Inflammatory and Proteolytic Response in Human Atherosclerotic Plaques," *Circulation*, vol. 108, no. 9, pp. 1070–1077, Sep. 2003.
- [239] L. Park *et al.*, "Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts," *Nat. Med.*, vol. 4, no. 9, p. 1025, Sep. 1998.
- [240] L. G. Bucciarelli *et al.*, "RAGE Blockade Stabilizes Established Atherosclerosis in Diabetic Apolipoprotein E-Null Mice," *Circulation*, vol. 106, no. 22, pp. 2827–2835, Nov. 2002.
- [241] T. Wendt *et al.*, "RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes," *Atherosclerosis*, vol. 185, no. 1, pp. 70–77, Mar. 2006.
- [242] R. Bucala, K. J. Tracey, and A. Cerami, "Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes," *J. Clin. Invest.*, vol. 87, no. 2, pp. 432–438, Feb. 1991.
- [243] B. Xu, R. Chibber, D. Ruggiero, E. Kohner, J. Ritter, and A. Ferro, "Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products," *FASEB J.*, vol. 17, no. 10, pp. 1289–1291, Jul. 2003.
- [244] S. Yamagishi, H. Fujimori, H. Yonekura, Y. Yamamoto, and H. Yamamoto, "Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells," *Diabetologia*, vol. 41, no. 12, pp. 1435–1441, Nov. 1998.
- [245] P. Quehenberger *et al.*, "Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells," *Diabetes*, vol. 49, no. 9, pp. 1561–1570, Sep. 2000.
- [246] A. M. Schmidt *et al.*, "Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes," *J. Clin. Invest.*, vol. 96, no. 3, pp. 1395–1403, Sep. 1995.
- [247] E. Hayakawa, T. Yoshimoto, N. Sekizawa, T. Sugiyama, and Y. Hirata, "Overexpression of receptor for advanced glycation end products induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cell line," *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 19, no. 1, pp. 13–22, 2012.
- [248] S. Ping *et al.*, "Simultaneous Increases in Proliferation and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Accelerate Diabetic Mouse Venous Atherosclerosis," *PloS One*, vol. 10, no. 10, p. e0141375, 2015.

- [249] Y. Li *et al.*, "RAGE mediates accelerated diabetic vein graft atherosclerosis induced by combined mechanical stress and AGEs via synergistic ERK activation," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e35016, 2012.
- [250] X. Jin *et al.*, "Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF- κ B Pathway," *BioMed Res. Int.*, vol. 2015, p. 732450, 2015.
- [251] M. Peled and E. A. Fisher, "Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression," *Front. Immunol.*, vol. 5, Nov. 2014.
- [252] A. Bierhaus *et al.*, "Advanced Glycation End Product (AGE)-Mediated Induction of Tissue Factor in Cultured Endothelial Cells Is Dependent on RAGE," *Circulation*, vol. 96, no. 7, pp. 2262–2271, Oct. 1997.
- [253] T. Kislinger *et al.*, "Receptor for advanced glycation end products mediates inflammation and enhanced expression of tissue factor in vasculature of diabetic apolipoprotein E-null mice," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 21, no. 6, pp. 905–910, Jun. 2001.
- [254] H. Cai *et al.*, "Serum amyloid A induces monocyte tissue factor," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 178, no. 3, pp. 1852–1860, Feb. 2007.
- [255] M. Hangaishi *et al.*, "Increased aggregation of human platelets produced by advanced glycation end products in vitro," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 248, no. 2, pp. 285–292, Jul. 1998.
- [256] E. Herczenik *et al.*, "Activation of human platelets by misfolded proteins," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no. 7, pp. 1657–1665, Jul. 2007.
- [257] Y. Wang *et al.*, "Platelet-derived S100 family member myeloid-related protein-14 regulates thrombosis," *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 5, pp. 2160–2171, May 2014.
- [258] W. Zhu, W. Li, and R. L. Silverstein, "Advanced glycation end products induce a prothrombotic phenotype in mice via interaction with platelet CD36," *Blood*, vol. 119, no. 25, pp. 6136–6144, Jun. 2012.
- [259] X. Ren, H. Shao, Q. Wei, Z. Sun, and N. Liu, "Advanced glycation end-products enhance calcification in vascular smooth muscle cells," *J. Int. Med. Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 847–854, Jun. 2009.
- [260] M. A. Hofmann Bowman *et al.*, "S100A12 in vascular smooth muscle accelerates vascular calcification in apolipoprotein E-null mice by activating an osteogenic gene regulatory program," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 2, pp. 337–344, Feb. 2011.
- [261] T. Suga *et al.*, "Activation of receptor for advanced glycation end products induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells," *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 18, no. 8, pp. 670–683, 2011.

- [262] T. Tanikawa, Y. Okada, R. Tanikawa, and Y. Tanaka, "Advanced glycation end products induce calcification of vascular smooth muscle cells through RAGE/p38 MAPK," *J. Vasc. Res.*, vol. 46, no. 6, pp. 572–580, 2009.
- [263] Q. Wei, X. Ren, Y. Jiang, H. Jin, N. Liu, and J. Li, "Advanced glycation end products accelerate rat vascular calcification through RAGE/oxidative stress," *BMC Cardiovasc. Disord.*, vol. 13, p. 13, Mar. 2013.
- [264] M. R. Brodeur *et al.*, "Reduction of Advanced-Glycation End Products Levels and Inhibition of RAGE Signaling Decreases Rat Vascular Calcification Induced by Diabetes," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, Jan. 2014.
- [265] F. Duranton *et al.*, "Normal and pathologic concentrations of uremic toxins," *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 23, no. 7, pp. 1258–1270, Jul. 2012.
- [266] R. Vanholder *et al.*, "Uremic toxicity: present state of the art," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 24, no. 10, pp. 695–725, Oct. 2001.
- [267] T. Miyata *et al.*, "Accumulation of carbonyls accelerates the formation of pentosidine, an advanced glycation end product: carbonyl stress in uremia," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 9, no. 12, pp. 2349–2356, Dec. 1998.
- [268] A. Gugliucci and M. Bendayan, "Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells," *Diabetologia*, vol. 39, no. 2, pp. 149–160, Feb. 1996.
- [269] T. Miyata *et al.*, "Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine," *Kidney Int.*, vol. 53, no. 2, pp. 416–422, Feb. 1998.
- [270] A. Oesterle and M. A. H. Bowman, "S100A12 and the S100/Calgranulins," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 35, no. 12, pp. 2496–2507, Dec. 2015.
- [271] S. Simic-Ogrizovic, V. Dopsaj, N. Bogavac-Stanojevic, I. Obradovic, M. Stosovic, and M. Radovic, "Serum Amyloid-A Rather Than C-Reactive Protein Is a Better Predictor of Mortality in Hemodialysis Patients," *Tohoku J. Exp. Med.*, vol. 219, no. 2, pp. 121–127, 2009.
- [272] A. Bruchfeld *et al.*, "High Mobility Group Box Protein-1 Correlates with Renal Function in Chronic Kidney Disease (CKD)," *Mol. Med.*, vol. 14, no. 3–4, pp. 109–115, 2008.
- [273] R. Meerwaldt, C. J. Zeebregts, G. Navis, J.-L. Hillebrands, J. D. Lefrandt, and A. J. Smit, "Accumulation of Advanced Glycation End Products and Chronic Complications in ESRD Treated by Dialysis," *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 53, no. 1, pp. 138–150, Jan. 2009.
- [274] N. Isoyama *et al.*, "Plasma S100A12 and soluble receptor of advanced glycation end product levels and mortality in chronic kidney disease Stage 5 patients," *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.*, vol. 30, no. 1, pp. 84–91, Jan. 2015.

- [275] T. Weichhart *et al.*, "Serum Amyloid A in Uremic HDL Promotes Inflammation," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 23, no. 5, pp. 934–947, May 2012.
- [276] S. Bro *et al.*, "A neutralizing antibody against receptor for advanced glycation end products (RAGE) reduces atherosclerosis in uremic mice," *Atherosclerosis*, vol. 201, no. 2, pp. 274–280, Dec. 2008.
- [277] Z. Dong *et al.*, "Serum amyloid A directly accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice," *Mol. Med. Camb. Mass.*, vol. 17, no. 11–12, pp. 1357–1364, 2011.
- [278] S. D. Yan *et al.*, "Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis," *Nat. Med.*, vol. 6, no. 6, pp. 643–651, Jun. 2000.
- [279] Z. Wang *et al.*, "Advanced glycation end-product Nε-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes," *Atherosclerosis*, vol. 221, no. 2, pp. 387–396, Apr. 2012.
- [280] K.-C. Lu, C.-C. Wu, J.-F. Yen, and W.-C. Liu, "Vascular calcification and renal bone disorders," *ScientificWorldJournal*, vol. 2014, p. 637065, 2014.
- [281] K. Yang *et al.*, "Indoxyl sulfate induces platelet hyperactivity and contributes to chronic kidney disease-associated thrombosis in mice," *Blood*, vol. 129, no. 19, pp. 2667–2679, May 2017.
- [282] M. Buzello, J. Törnig, J. Faulhaber, H. Ehmke, E. Ritz, and K. Amann, "The Apolipoprotein E Knockout Mouse: A Model Documenting Accelerated Atherogenesis In Uremia," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 14, no. 2, pp. 311–316, Feb. 2003.
- [283] S. J. House, M. Potier, J. Bisailon, H. A. Singer, and M. Trebak, "The non-excitable smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease," *Pflugers Arch.*, vol. 456, no. 5, pp. 769–785, Aug. 2008.
- [284] C. M. Shanahan, M. H. Crouthamel, A. Kapustin, and C. M. Giachelli, "Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate," *Circ. Res.*, vol. 109, no. 6, pp. 697–711, Sep. 2011.
- [285] G. Molostvov *et al.*, "Extracellular calcium-sensing receptor is functionally expressed in human artery," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 293, no. 3, pp. F946–955, Sep. 2007.
- [286] M. Alam *et al.*, "Calcification is associated with loss of functional calcium-sensing receptor in vascular smooth muscle cells," *Cardiovasc. Res.*, vol. 81, no. 2, pp. 260–268, Feb. 2009.
- [287] Z. A. Massy, L. Hénaut, T. E. Larsson, and M. G. Vervloet, "Calcium-Sensing Receptor Activation in Chronic Kidney Disease: Effects Beyond Parathyroid Hormone Control," *Semin. Nephrol.*, vol. 34, no. 6, pp. 648–659, Nov. 2014.

- [288] S. J. Zieman, V. Melenovsky, and D. A. Kass, "Mechanisms, Pathophysiology, and Therapy of Arterial Stiffness," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 5, pp. 932–943, May 2005.
- [289] J. Blacher, A. P. Guerin, B. Pannier, S. J. Marchais, M. E. Safar, and G. M. London, "Impact of Aortic Stiffness on Survival in End-Stage Renal Disease," *Circulation*, vol. 99, no. 18, pp. 2434–2439, May 1999.
- [290] H. Qiu *et al.*, "Short Communication: Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness As a Mechanism for Increased Aortic Stiffness With Aging Novelty and Significance," *Circ. Res.*, vol. 107, no. 5, pp. 615–619, Sep. 2010.
- [291] A.-S. Garnier and M. Briet, "Arterial Stiffness and Chronic Kidney Disease," *Pulse Basel Switz.*, vol. 3, no. 3–4, pp. 229–241, Apr. 2016.
- [292] N. Grossin *et al.*, "Dietary CML-enriched protein induces functional arterial aging in a RAGE-dependent manner in mice," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 59, no. 5, pp. 927–938, May 2015.
- [293] C. J. Hartley, A. K. Reddy, S. Madala, M. L. Entman, L. H. Michael, and G. E. Taffet, "Doppler velocity measurements from large and small arteries of mice," *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.*, vol. 301, no. 2, pp. H269–H278, Aug. 2011.
- [294] S. Vogel *et al.*, "Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis," *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 12, pp. 4638–4654.
- [295] I. Ahrens *et al.*, "HMGB1 binds to activated platelets via the receptor for advanced glycation end products and is present in platelet rich human coronary artery thrombi," *Thromb. Haemost.*, vol. 114, no. 5, pp. 994–1003, Nov. 2015.
- [296] J. Chen, S. De, D. S. Damron, W. S. Chen, N. Hay, and T. V. Byzova, "Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice," *Blood*, vol. 104, no. 6, pp. 1703–1710, Sep. 2004.
- [297] D. Woulfe, H. Jiang, A. Morgans, R. Monks, M. Birnbaum, and L. F. Brass, "Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2," *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 3, pp. 441–450, Feb. 2004.
- [298] D. S. Woulfe, "Akt signaling in platelets and thrombosis," *Expert Rev. Hematol.*, vol. 3, no. 1, pp. 81–91, Feb. 2010.
- [299] J. E. Aslan and O. J. T. McCarty, "Rho GTPases in platelet function," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 11, no. 1, pp. 35–46, Jan. 2013.
- [300] F. Touré *et al.*, "Formin mDia1 Mediates Vascular Remodeling via Integration of Oxidative and Signal Transduction Pathways Novelty and Significance," *Circ. Res.*, vol. 110, no. 10, pp. 1279–1293, May 2012.
- [301] E. Mercier *et al.*, "Open Journal Systems."

- [302] K. Pawlak, J. Tankiewicz, M. Mysliwiec, and D. Pawlak, "Tissue factor/its pathway inhibitor system and kynurenines in chronic kidney disease patients on conservative treatment," *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.*, vol. 20, no. 7, pp. 590–594, Oct. 2009.
- [303] B. Gondouin *et al.*, "Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway," *Kidney Int.*, vol. 84, no. 4, pp. 733–744, Oct. 2013.
- [304] K. A. Aissa *et al.*, "Vascular Smooth Muscle Cells Are Responsible for a Prothrombotic Phenotype of Spontaneously Hypertensive Rat Arteries," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, p. ATVBAHA.115.305377, Jan. 2015.
- [305] J. Pindjakova and M. D. Griffin, "Defective neutrophil rolling and transmigration in acute uremia," *Kidney Int.*, vol. 80, no. 5, pp. 447–450, Sep. 2011.
- [306] J.-K. Kim, C.-W. Hong, M. J. Park, Y. R. Song, H. J. Kim, and S. G. Kim, "Increased Neutrophil Extracellular Trap Formation in Uremia Is Associated with Chronic Inflammation and Prevalent Coronary Artery Disease," *J. Immunol. Res.*, vol. 2017, p. 8415179, 2017.
- [307] S.-J. Kim and C. N. Jenne, "Role of platelets in neutrophil extracellular trap (NET) production and tissue injury," *Semin. Immunol.*, vol. 28, no. 6, pp. 546–554, Dec. 2016.
- [308] B. A. Boone *et al.*, "The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Enhances Autophagy and Neutrophil Extracellular Traps in Pancreatic Cancer," *Cancer Gene Ther.*, vol. 22, no. 6, pp. 326–334, Jun. 2015.
- [309] Y.-H. Ma *et al.*, "High-mobility group box 1 potentiates antineutrophil cytoplasmic antibody-inducing neutrophil extracellular traps formation," *Arthritis Res. Ther.*, vol. 18, p. 2, Jan. 2016.
- [310] K. Stark *et al.*, "Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice," *Blood*, vol. 128, no. 20, pp. 2435–2449, Nov. 2016.
- [311] E. O. Apostolov, D. Ray, A. V. Savenka, S. V. Shah, and A. G. Basnakian, "Chronic Uremia Stimulates LDL Carbamylation and Atherosclerosis," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 21, no. 11, pp. 1852–1857, Nov. 2010.
- [312] E. Ok, A. G. Basnakian, E. O. Apostolov, Y. M. Barri, and S. V. Shah, "Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells: a link to atherosclerosis in patients with kidney disease," *Kidney Int.*, vol. 68, no. 1, pp. 173–178, Jul. 2005.
- [313] E. O. Apostolov, A. G. Basnakian, X. Yin, E. Ok, and S. V. Shah, "Modified LDLs induce proliferation-mediated death of human vascular endothelial cells through MAPK pathway," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 292, no. 4, pp. H1836–1846, Apr. 2007.
- [314] D. El-Gamal *et al.*, "The urea decomposition product cyanate promotes

endothelial dysfunction," *Kidney Int.*, vol. 86, no. 5, pp. 923–931, Nov. 2014.

[315] V. Binder *et al.*, "Impact of Fibrinogen Carbamylation on Fibrin Clot Formation and Stability," *Thromb. Haemost.*, vol. 117, no. 5, pp. 899–910, May 2017.

[316] L. Park *et al.*, "Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts," *Nat. Med.*, vol. 4, no. 9, pp. 1025–1031, Sep. 1998.

[317] M. T. Goova *et al.*, "Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice," *Am. J. Pathol.*, vol. 159, no. 2, pp. 513–525, Aug. 2001.

[318] T. M. Wendt *et al.*, "RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy," *Am. J. Pathol.*, vol. 162, no. 4, pp. 1123–1137, Apr. 2003.

[319] S. Reverdatto, V. Rai, J. Xue, D. S. Burz, A. M. Schmidt, and A. Shekhtman, "Combinatorial library of improved peptide aptamers, CLIPs to inhibit RAGE signal transduction in mammalian cells," *PloS One*, vol. 8, no. 6, p. e65180, 2013.

[320] S. Bongarzone, V. Savickas, F. Luzi, and A. D. Gee, "Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective," *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 17, pp. 7213–7232, Sep. 2017.

[321] S. G. Rani, K. M. Sepuru, and C. Yu, "Interaction of S100A13 with C2 domain of receptor for advanced glycation end products (RAGE)," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1844, no. 9, pp. 1718–1728, Sep. 2014.

[322] M. B. Manigrasso *et al.*, "Small Molecule Inhibition of Ligand-Stimulated RAGE-DIAPH1 Signal Transduction," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 22450, Mar. 2016.

Résumé

Les évènements cardiovasculaires sont la première cause de mortalité chez les patients insuffisants rénaux chroniques. Ces complications font suite à des modifications structurelles et fonctionnelles de la paroi vasculaire regroupées sous le terme de vasculopathie urémique. Parallèlement à ces modifications vasculaires, l'urémie s'accompagne d'une accumulation de substances non épurées par le rein appelées toxines urémiques, telles que les produits de la glycation avancée (AGEs) ou les ligands de RAGE. Ces toxines peuvent interagir avec leur récepteur, RAGE, qui est pro-inflammatoire et impliqué dans le remodelage artériel. Cette thèse a consisté en l'étude, chez la souris, du rôle de l'accumulation des ligands de RAGE et de leur interaction avec celui-ci dans le développement de l'athérosclérose, des calcifications vasculaires et de la thrombose artérielle au cours de l'insuffisance rénale chronique (IRC). Dans un premier temps, nous avons montré que l'IRC conduisait à une accumulation des AGEs et des ligands de RAGE sériques et tissulaires, ainsi qu'une augmentation de l'expression de RAGE au sein de la paroi vasculaire participant à la formation des plaques d'athérome. Dans un second temps, nous avons démontré que RAGE participait aux calcifications vasculaires favorisant l'expression de co-transporteur de phosphate inorganique (Pit-1), induisant la différenciation des cellules musculaires lisses en cellules « osteoblast-like ». Enfin, nous avons montré que RAGE participait à la formation d'un thrombus artériel dû à une hyperactivité plaquettaire. En conclusion, cette thèse a permis de renforcer le concept que l'axe ligands de RAGE/RAGE est un acteur important dans la vasculopathie urémique.

Mots-clés : Produit de glycation avancée (AGEs) , RAGE, Insuffisance rénale chronique, vasculopathie urémique

Abstract

Cardiovascular events are the primary cause of morbidity and mortality in chronic kidney disease patients. These complications are due to structural and functional changes in the vascular wall named uremic vasculopathy. Alongside these vascular changes, uremia is accompanied by the retention of various solutes that are normally excreted by the kidneys called uremic toxins, such as the products of advanced glycation (AGEs) or the ligands of RAGE. These toxins may interact with their receptor, RAGE, which is pro-inflammatory and involved in arterial remodeling. The aim of this thesis was to study, in mice, the role of the accumulation of RAGE ligands and their interaction with it in the development of atherosclerosis, vascular calcification and arterial thrombosis in chronic renal failure (CKD). Initially, we showed that CKD leads to an accumulation of serum and tissue AGEs and RAGE ligands, as well as an increase in RAGE expression in the vascular wall involved in atheroma plaque formation. Secondly, we have demonstrated that RAGE is involved in vascular calcification promoting the expression of inorganic phosphate cotransporter (Pit-1), inducing the differentiation of smooth muscle cells "osteoblast-like". Finally, we showed that RAGE participated in the formation of arterial thrombus due to platelet hyperactivity. In conclusion this thesis consolidates that RAGE-RAGE ligands axis is an important actor in uremic vasculopathy.

Keywords : Advanced glycation end-products (AGEs), RAGE, Chronic kidney disease, uremic vasculopathy

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Biochimie - Biologie cellulaire

Université de Reims Champagne-Ardenne

UMR CNRS/URCA n°7369 MEDyC

(Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire)

51095 REIMS

