

Université de Montréal

Sélection *in vivo* par *phage display* dans un modèle de sténose valvulaire aortique chez la souris pour la découverte de nouveaux peptides ciblant la valve aortique

[Tapez ici le sous-titre de la thèse, s'il y a lieu]

par

Kurunradeth Uy

Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté Médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Sciences Biomédicales

30 avril, 2015

© Kurunradeth Uy, 2015

Résumé

La sténose valvulaire aortique (SVA) est la maladie des valves cardiaques la plus répandue dans les pays développés qui touche les personnes âgées. La SVA est un processus actif caractérisé par des dépôts de lipides, de l'inflammation, de la fibrose et une calcification active des feuillets qui progresse vers un épaissement et durcissement de la valve aortique et une diminution de l'aire de la valve aortique. Nous avons émis l'hypothèse que la pathogénèse de la SVA modifie progressivement l'endothélium de la valve aortique, ce qui engendre l'expression de biomarqueurs spécifiques aux tissus et à la maladie.

On rapporte dans cet étude, l'utilisation de la technique de sélection *in vivo* par *phage display* d'une librairie de peptides aléatoires afin de trouver de nouveaux peptides candidats qui se lieraient à des biomarqueurs spécifiques à la valve aortique malade d'une souris. Des souris ATX (LDLr^{-/-};Tg(hApoB^{+/+})) âgées atteintes de la SVA ont été utilisées pour la sélection *in vivo* d'une librairie de peptides aléatoires de 7 acides aminés contraints ou linéaires. Après 4 tours de criblage, on a caractérisé 14 phages différents qui ont été séparés en 5 motifs consensus pour la librairie linéaire et 11 phages différents qui représentent 5 différents motifs consensus pour la librairie de peptides contraints.

La spécificité de 4 phages candidats de la librairie linéaire et de 5 phages de la librairie contrainte a été étudiée par l'immunomarquage des peptides d'intérêt exprimés par les phages sur les coupes de tissus de la valve aortique malade par rapport aux tissus contrôles du foie, du rein, de la rate, du ventricule et du poumon. Parmi eux, 6 phages représentent des peptides candidats intéressants qui ont besoin d'être testés davantage pour évaluer leur spécificité *in vivo* à la valve.

Bien qu'il reste encore de la validation à effectuer, les peptides candidats spécifiques trouvés peuvent représenter des agents moléculaires d'imagerie utiles ou des transporteurs dans la livraison de drogue qui ciblent la valve aortique malade.

Mots-clés : *Phage display*, *in vivo*, sténose valvulaire aortique, imagerie, modèle animal

Abstract

Aortic valve stenosis (AVS) is the most prevalent valvular heart disease that affects the elderly in developed country. The active disease process is characterized by lipid deposition, inflammation, fibrosis and active leaflet calcification that progress into the thickening and stiffening of the aortic valve, decreasing the aortic valve orifice. We hypothesized that the pathogenesis of AVS modifies progressively the valvular endothelium leading to the expression of tissue and disease-specific biomarkers.

Here, we report the use of *in vivo phage display* screenings of random peptide libraries to discover new peptide candidates that target impaired aortic valves in mice. Old Ldlr^{-/-};hApoB^{+/+} mice with AVS were used for the *in vivo* screening of a constrained or a linear random 7 amino acids phage library. After 4 rounds of screening, we characterized 14 different phages that were separated in 5 repeated consensus motifs for the linear library and 11 different phages representing 5 different consensus motifs for the constrained library.

The specificity of 4 candidate phages from the linear library and of 5 phages from the constrained library was studied by immunostaining of phages displaying the consensus peptide sequence of interest in tissue slices of aortic valve compared to control tissues from liver, kidney, ventricle, spleen and lungs. Among those, 4 phages represent interesting candidate peptides that will need to be further tested to assess their *in vivo* specificity to the valve.

Although further validation remains to be performed, the candidate homing peptides found could represent useful molecular imaging agents or therapeutic delivery carriers to target diseased aortic valves.

Keywords : *Phage display, in vivo*, aortic valvular stenosis, animal model, imaging,

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste de sigles et abréviations.....	viii
Remerciements.....	xii
1. Introduction.....	1
1.1. Sténose valvulaire aortique.....	1
1.1.1. Définition de la pathologie.....	1
1.1.2. Épidémiologie.....	1
1.1.3. Facteurs de risque.....	2
1.1.4. Anatomie de la valve aortique humaine saine.....	2
1.1.5. Histo-pathologie de la SVA.....	3
1.1.6. Pathophysiologie du rétrécissement de la valve aortique.....	4
1.1.7. Hypertrophie du ventricule gauche.....	13
1.1.8. Modèles <i>in vivo</i> de la SVA.....	14
1.1.9. Stratégies de traitements et de thérapies.....	19
1.2. <i>Phage display</i>	26
1.2.1. Découverte par Dr George P. Smith du <i>phage display</i>	27
1.2.2. Biologie du phage.....	28
1.2.3. Principe de l'expression des peptides sur le phage.....	30
1.2.4. Principes de sélection par <i>phage display</i>	40
1.2.5. Applications du <i>phage display</i>	46
1.2.6. Application du <i>phage display</i> pour le ciblage thérapeutique.....	51
1.2.7. Applications du <i>phage display</i> pour l'imagerie.....	52

1.3.	Hypothèse et buts	54
2.	Matériel et méthodes	55
2.1.	Matériel	55
2.1.1.	Préparation du matériel pour le <i>phage display</i>	55
2.2.	Modèles animaux de la sténose valvulaire aortique	57
2.2.1.	Approbation du comité d'éthique	57
2.2.2.	Animaux	57
2.2.3.	Échocardiographie	57
2.3.	Sélection <i>in vivo</i> par phage display	58
2.3.1.	Protocole de sélection <i>in vivo</i> chez la souris ATX	58
2.3.2.	Extraction des tissus	59
2.4.	Amplification, titrage et séquençage des clones de phages	60
2.4.1.	Amplification	60
2.4.2.	Quantification par titration	61
2.4.3.	Purification de l'ADN des clones de phages	62
2.4.4.	Analyse des séquences	63
2.5.	Immunohistochimie	63
2.5.1.	Préparation des échantillons	63
2.5.2.	Protocole d'immunohistochimie	63
2.6.	Analyse statistique	65
	<i>In vivo</i> phage display screening using a mouse model of aortic valve stenosis for the discovery of new homing peptides to the aortic valve	Error! Bookmark not defined.
	Abstract	Error! Bookmark not defined.
	Introduction	Error! Bookmark not defined.
	Materials and methods	Error! Bookmark not defined.
	Results	Error! Bookmark not defined.
	Discussion	Error! Bookmark not defined.
	References	Error! Bookmark not defined.
	Figures	Error! Bookmark not defined.
	TABLES	Error! Bookmark not defined.

Supplementary data.....	Error! Bookmark not defined.
3. Discussion.....	101
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

No table of figures entries found.

Liste des figures

Figure 1. Représentation histologique d'une valve aortique humaine normale. CEVs : cellules endothéliales de valves; CIVs : cellules interstitielles de valves. Adapté de Leopold, J.A., 2012.....	3
Figure 2. Résumé des rôles des cellules interstitielles de valves dans la pathogénèse de la SVA. CIVs : cellules interstitielles de valves; MMPs : métalloprotéinases matricielles; SVA : sténose valvulaire aortique; TIMPs : Inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases. Adapté de Liu, A.C. <i>et al.</i> , 2007.	9
Figure 3. Représentation des interactions entre les lipides, l'inflammation avec la génétique dans la pathogénèse de la calcification de la valve aortique. ALP : phosphatase alcaline; AngII : angiotensine II; Hrt : hairy-related family of transcription factors; LDLox : lipoprotéines oxydées de faible densité; MMP : métalloprotéinases matricielles; cellules interstitielles de valves. Adapté d'O'Brien, K.D., 2006.	12
Figure 4 : La structure du phage filamenteux M13. Adapté de Bratkovič, T., 2010.	29
Figure 5. Schéma d'un tour de sélection <i>in vivo</i> par phage display chez la souris. Adapté de Bábíčková <i>et al.</i> , 2013.	42
Figure 6. Schéma d'une sélection <i>in vivo</i> en série synchrone chez la souris. Adapté de Kolonin, M.G. <i>et al.</i> , 2006.	51

Liste de sigles et abréviations

XGAL:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacto-pyranoside
A-SMA:	<i>Alpha-smooth muscle actine</i>
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ALP :	Phosphatase alcaline
ARN:	Acide ribonucléique
ASTRONOMER:	<i>Aortic Stenosis Progression Observation : Measuring Effect of Rovustatin</i>
ApoA-I:	Apolipoprotéine A-I
ApoB :	Apolipoprotéine B-100
ApoE :	Apolipoprotéine E
ApoBhA :	Apolipoprotéine B-100 humaine
ATX :	Athérosclérotique
AVA	Aire de la valve aortique
AVS :	<i>Aortic valvular stenosis</i> (Sténose valvulaire aortique)
BLAST :	<i>Basic local alignment tool</i>
CEVs :	Cellules endothéliales de valves
CIVs :	Cellules interstitielles de valves
CTGF :	<i>Connective tissue growth factor</i>
DMF :	Diméthyle formamide
DRO :	Dérivés réactifs de l'oxygène
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia Coli</i>
ECA :	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ELISA :	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
ErbB2:	<i>Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Ff :	Phage filamenteux
FR :	Forme répliquative
HDL :	Lipoprotéine à haute densité

HOC	Protéine de capsid e extérieure hautement immunogénique
Hrt :	<i>Hairy-related family of transcription factors</i>
TGFβ-1 :	Facteur de croissance de transformation bêta-1
TNF-α:	Facteur de nécrose tumorale alpha
IL-1β :	Interleukine-1β
IL-11 :	Interleukine-11
IPTG:	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Lp(a):	Lipoprotéine a
LB:	Lysogeny-Broth
LDL :	Lipoprotéine de basse densité
LDLox:	Lipoprotéine de basse densité oxydée
LDLr :	Récepteur de lipoprotéine de basse densité
MMP :	Métalloprotéinase matricielle
MTTP :	Protéine de transfert de triglycérides microsoma les
NaCl :	Chlorure de sodium
OPG :	Ostéoprotégérine
OCT :	<i>optimal cutting temperature compound</i>
PARTNER:	Placement of AoRtic TraNscathetER Valves/Mise en place de valves aortiques transcathéters
PEG :	Polyéthylène glycol
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
Pfu	Plaque-forming unit
SNP :	Polymorphisme d'un seul nucléotide
RVA	Remplacement de la valve aortique
SALTIRE:	<i>Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression</i>
SAB:	Sérum d'albumine bovin
SEAS:	<i>Simvastatine and Ezetimibe in Aortic Stenosis</i>
SNC:	Sérum normal de chèvre
SVA :	Sténose valvulaire aortique
SVAc :	Sténose valvulaire aortique calcifiée
TAVI :	L'implantation de valve aortique par cathéter

TIMPs : Inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases
TUP : *Target unrelated peptide*
VCAM-1 : Molécule-1 d'adhérence de cellules vasculaires

*Je dédie ce mémoire à mes chers parents
qui ont toujours été là pour moi
au long de mes études*

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je tiens tout d'abord à remercier tout particulièrement mes directeurs de recherche, le Dr. Éric Rhéaume et le Dr. Jean-Claude Tardif de m'avoir accepté dans le laboratoire et de leur supervision du projet. Leur confiance en moi et leur intérêt pour ce projet m'a permis de me dépasser, de développer mon esprit scientifique, d'agrandir mes connaissances et d'alimenter ma réflexion.

Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance envers chacun de mes collègues du laboratoire qui m'ont accueilli et apporté leur support moral et intellectuel tout au long du projet. Un grand merci à Gabriel Théberge-Julien pour son aide dans l'initiation du projet, de son support et de ses conseils inestimable durant ce travail. Je voudrais remercier Téodora Mihalache-Avram pour son l'aide considérable qu'elle m'a apporté dans la réalisation du projet. Je tiens à témoigner ma gratitude à Daniel Charpentier et à Mathieu Brodeur pour leurs précieux conseils et supports pour les réflexions scientifiques et la réalisation du mémoire.

Finalement, mes sincères remerciements vont à mes parents, ma grand-mère et à ma famille pour leurs soutiens et leurs encouragements durant mes études.

1. Introduction

1.1. Sténose valvulaire aortique

La sténose valvulaire aortique (SVA) est une maladie valvulaire dont la prévalence augmente avec le vieillissement de la population. Le traitement principal est une chirurgie de remplacement valvulaire. Sa pathogénèse est un processus actif impliquant le dépôt de lipides, de l'inflammation et la calcification des feuillets.(1)

1.1.1. Définition de la pathologie

La SVA se caractérise par un rétrécissement progressif anormal de la valve aortique causé par un processus continu de remodelage et de calcification ce qui va augmenter la pression de postcharge du ventricule gauche et donc nuire à la circulation sanguine à la sortie du cœur. La pathologie progresse en une calcification de la sténose valvulaire aortique.(2, 3) L'aire de la valve aortique normale (AVA) peut être aussi petite que 2 cm^2 .(4) En condition pathologique, l'AVA peut atteindre des valeurs inférieures à 1 cm^2 pour les cas de SVA très sévères.(5) Le jet de vélocité qui correspond à la vitesse trans-valvulaire du sang est proche de 1 m/s pour une valve aortique normale alors que dans le cas d'une SVA sévère, la valeur est égale ou supérieure à 4 m/s .(5) La différence de pression entre le ventricule gauche et l'aorte en systole représente le gradient moyen de la pression trans-aortique valvulaire. Un gradient moyen de pression plus élevé que 40 mm Hg en l'absence d'un changement du volume d'éjection est considéré comme étant un signe d'une SVA sévère.(5) Le diagnostic et le classement des différentes formes de la SVA par échocardiographie tiennent compte de l'AVA, le gradient moyen de la pression trans-aortique valvulaire et du jet de vélocité.(5, 6)

1.1.2. Épidémiologie

La SVA est la raison principale pour un remplacement valvulaire chez les personnes âgées en Amérique du Nord et en Europe. Selon les résultats de l'Euro Heart Survey, la SVA est la maladie valvulaire la plus diagnostiquée parmi les patients référés dans les hôpitaux.(7) Des études sur 4 populations en Europe et aux États-Unis indiquent que la prévalence de la

sténose aortique augmente avec l'âge et atteint 2 à 3% des individus âgés de plus de 65 ans.(8, 9) Des études basées sur la population aux États-Unis indiquent que le nombre de patient âgés de 75 ans et plus atteints au moins d'une SA modérée va augmenter dans les 50 prochaines années. Cette maladie valvulaire représentera un fardeau élevé pour le système de la santé avec l'augmentation des chirurgies pour le remplacement de la valve aortique.(10)

1.1.3. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque de la SVA sont associés avec l'athérosclérose. Les facteurs de risque identifiés par des analyses multivariées incluent l'hypertension, un taux élevé de lipoprotéine de basse densité (LDL), un niveau élevé de lipoprotéine (a) (Lp(a)), l'âge, le sexe masculin, être fumeur, être diabétique et une petite stature.(2, 3, 11, 12) Une dysfonction rénale et des problèmes avec le métabolisme du calcium et du phosphate contribuent au développement de la SVA.(2) La prédisposition génétique pour la SVA joue aussi un rôle comme démontrée par la découverte d'un polymorphisme d'un seul nucléotide associé à la calcification de la valve aortique dans le locus de la Lp(a), le rs10455872.(13). Les patients avec une valve bicuspide congénitale sont aussi sujets à de plus grands risques de développer une SVA.(8)

1.1.4. Anatomie de la valve aortique humaine saine

La valve aortique située entre le ventricule gauche du cœur et l'aorte est normalement composée de 3 valvules séparées par des commissures : la valvule dorsale, la valvule antéro-latérale gauche et la valvule antéro-latérale droite. Ces valvules mesurant moins de 1 mm d'épaisseur contiennent peu de cellules et ont une apparence lisse, mince et opaque.(9) La valve est avasculaire étant donné que les feuillets sont assez mince pour que le diffusion de l'oxygène, des nutriments et des déchets se fassent entre le tissu et la circulation sanguine.(14) La base de chaque feuillet de la valve est attachée à la racine aortique par une structure de collagène nommée l'annulus.(9) Les valvules sont séparées en 4 couches distinctes de tissu. La couche externe composé de cellules endothéliales de valves (CEVs) est l'endothélium.(15) Les 3 couches internes de la valve sont la *fibrosa*, la *spongiosa* et la *ventricularis* et sont formés de cellules interstitielles de valves (CIVs). (Figure 1) Les CIVs

sécrètent des composantes de la matrice extracellulaire comme la glycosaminoglycane, le collagène et l'élastine pour supporter la valve et la rendre élastique.(15-17). La *fibrosa*, située à la base du feuillet du côté de l'aorte, contient des fibres de collagènes denses et sert de support de charge. La *spongiosa*, située au centre du feuillet, est composée de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes. Elle permet à la valve de résister aux forces de compression et de lubrifier la *fibrosa* et la *ventricularis* contre les forces mécaniques et de cisaillement durant le cycle cardiaque.(9, 11, 15) La *ventricularis* est une couche flexible contenant du collagène et des fibres d'élastine orientées perpendiculairement aux fibres de collagène ce qui permet à la valve de réduire sa déformation radiale.(15, 18)

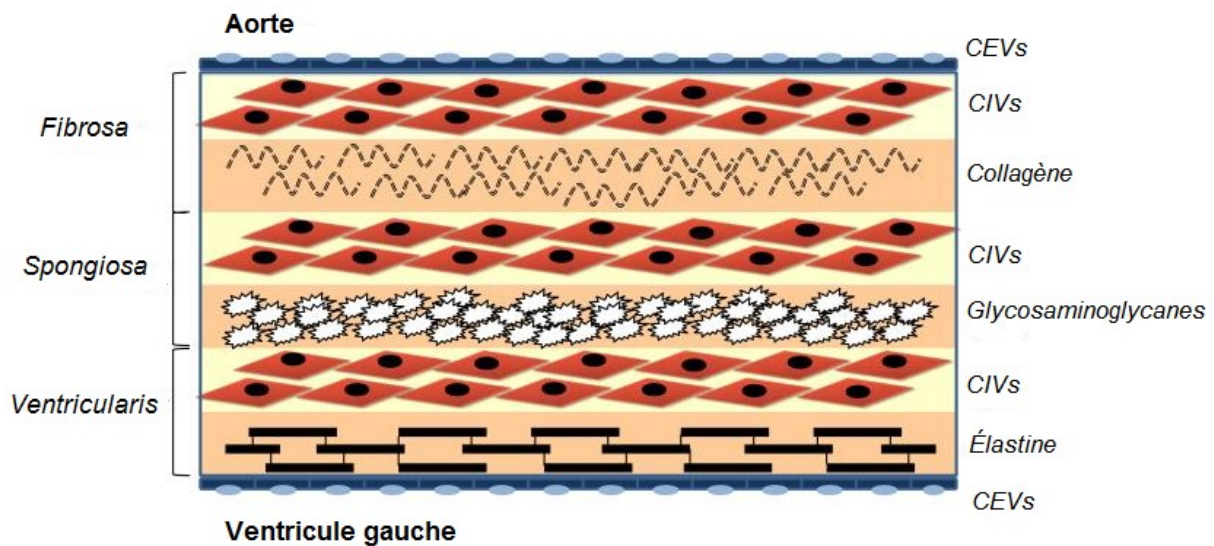


Figure 1. Représentation histologique d'une valve aortique humaine normale. CEVs : cellules endothéliales de valves; CIVs : cellules interstitielles de valves. Adapté de Leopold, J.A., 2012.

1.1.5. Histo-pathologie de la SVA

Au début, la théorie du «*wear and tear*» proposait que la calcification de la SVA était causée par un processus dégénératif des valvules associé à l'âge.(2, 9, 14) Cependant, des études récentes démontrent que la calcification de la valve aortique est un processus actif lié à l'inflammation suite au dépôt des LDLox (lipoprotéines de basse densité oxydées), du

remodelage de la matrice extracellulaire et de la calcification médiée par des cellules de type ostéoblastique.(19) Les valves deviennent progressivement plus épaisses, fibrosées et calcifiées (9) avec des signes d'inflammation, de néovascularisation et l'apparition de tissus mésenchymateux.(15) Cela résulte en une augmentation de la rigidité de la valve, une diminution des mouvements des valvules et une réduction progressive de l'aire de la valve aortique.(9)

1.1.6. Pathophysiologie du rétrécissement de la valve aortique

Malgré le fait que la prévalence de la SVA ne fait qu'augmenter avec le vieillissement de la population, les mécanismes responsables de la SVA ne sont pas clairement définis. (19) Des études récentes indiquent que le début de la SVA est semblable à la pathogénèse de l'athérosclérose et que c'est un processus actif.

1.1.6.1. Stress mécanique et dommages endothéliaux

Les premières étapes de la SVA sont susceptibles de débiter par des dommages à la couche endothéliale des feuillets dû à une distribution inefficace des forces mécaniques causant une augmentation du stress mécanique et une diminution des forces de cisaillements sur les trois feuillets.(9) En effet, le stress mécanique des valves aortiques est le plus élevé sur les feuillets du côté aortique dans la région flexible proche du site d'attachement à la racine aortique.(1) Cette région est impliquée dans 50% des lésions.(9) Les forces de cisaillements sont plus faibles à travers l'endothélium de la valvule dorsale comparé aux deux autres feuillets dû à l'absence de la circulation diastolique du cœur.(1) Ce phénomène explique pourquoi la valvule dorsale est fréquemment impliqué dans la SVA chez l'humain.(9) Les effets du stress mécanique sur la pathogénèse de la SVA sont démontrés par les valves bicuspidés. Les patients avec une valve bicuspide congénitale risquent de développer la SVA en moyenne 2 décennies plus tôt que les patients ayant une valve tricuspide.(10) Leur valve aortique composée de deux feuillets est soumise à une mauvaise distribution et plus grande concentration des forces mécaniques et de cisaillements de la circulation sanguine provenant de l'aorte.(1, 9, 10) Cela peut agir comme élément déclencheur de lésions dans la valve.

1.1.6.1.1. Dépôt lipidique

Les lésions endothéliales donnent accès aux lipides dans la valve. Les lipoprotéines retrouvées dans les sites lésés de la valve aortique proviennent des lipoprotéines de basse densité (LDL) et de la Lp(a). Elles sont reconnues pour être impliquées dans le processus de l'athérosclérose. Ces lipoprotéines et leurs lipides associés vont alors subir une oxydation qui les rend hautement cytotoxiques. Les LDLox vont stimuler une activité inflammatoire plus intense dans la valve aortique. L'accumulation de lipides va créer des cellules spumeuses, qui sont en fait des macrophages gorgés en LDL. Les cellules spumeuses meurent dans ces tissus malades et vont créer des débris cellulaires, relâcher des LDLox toxiques et des médiateurs pro-inflammatoires.(20) Une étude sur des valves humaines a montré que le niveau élevé de LDLox circulantes est associé à une augmentation de fibrose calcifiante des valves aortique chez les patients atteints de la SVA.(21)

1.1.6.2. Pathophysiologie de l'inflammation

Une valve aortique saine ne contient pas de cellules inflammatoires tandis qu'une valve malade présente des macrophages, des monocytes, des lymphocytes T et des mastocytes.(22, 23) Les lésions endothéliales de la valve permettent l'entrée des lipides et facilitent l'entrée des cellules inflammatoires dans la valve et leur accumulation. La pénétration des cellules inflammatoires au niveau de la *fibrosa* est facilité par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésions (moléculaires d'adhésion intercellulaire, molécules d'adhésions de cellules vasculaires et des sélectines).(11) Une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques telles que TNF- α HLA-DR, BMP-2/4/7/ et IL-1 β /2/6 est observée dans la valve.(20) Les molécules d'adhésions exprimées vont permettre l'infiltration dans les couches endothéliales des monocytes qui vont se différencier en macrophages. Les lymphocytes T pénètrent ensuite dans ces lésions et relâchent des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de croissance de transformation bêta-1 (TGF β -1)(24), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et l'interleukine-1 bêta (IL-1 β).(25)

Le niveau d'IL-1 β est augmenté dans les valves aortiques sténosées.(25) Les actions pro-inflammatoires de cette cytokine produite, entre autres, par les monocytes circulants sont contrôlées par l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire de l'inflammation.(26) Lorsque les macrophages attaquent les tissus malades, l'IL-1 β est relâché dans le tissu environnant et produit ses effets inflammatoires en stimulant l'expression de

gènes pro-inflammatoires. Les monocytes et l'IL-1 β ne sont pas retrouvés dans une valve aortique saine alors qu'ils se retrouvent tous les deux dans la valve aortique sténosée.(26) L'étude *in vitro* de Nadlonek et al.(26) démontre que l'IL-1 β stimule la transdifférenciation des cellules valvulaires aortiques interstitielles humaines en un phénotype inflammatoire. Elles produisent alors la molécule d'adhésion ICAM-1, les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 et la chimiokine MCP-1. Ces actions pro-inflammatoires d'IL-1 β sont contrôlées par NF-kB. L'IL-1 β stimule aussi l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMP) dans les valvules aortiques.(25)

Les mastocytes participent à l'inflammation dans la SVA.(27) Les mastocytes qui se sont infiltrés dans les valves aortiques produisent de la chymase. Cette protéase stimule la production de l'angiotensine II qui contrôle la transcription du gène du collagène par la stimulation de l'expression de TGF- β .(27) Helske et al.(27) a montré que le TGF- β 1 s'accumulait particulièrement dans les mastocytes ainsi que dans la matrice extracellulaire et les dépôts minéraux des valvules aortiques calcifiées.(24) Le TGF- β 1 peut contrôler la différenciation des cellules valvulaires interstitielles en un phénotype myofibroblastiques qui exprime l' α -SMA (*alpha-smooth muscle actin*). (11, 28) Les CIVs activées (avec le phénotype myofibroblastique) peuvent sécréter la matrice extracellulaire, des MMPs telles que MMP-1, MMP-2 et MMP-13 et des TIMPs (inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases).(11) Les mastocytes participent dans la dégradation de la matrice extracellulaire des valves durant la pathogénèse. Ils sont responsables de la sécrétion de protéases : la tryptase, la chymase et la cathepsine G.(27, 29) La tryptase peut dégrader l'endostatine, un inhibiteur de l'angiogénèse. La cathepsine G, une enzyme qui peut causer la fragmentation des fibres élastiques, est impliquée dans l'activation de la voie de signalisation de TGF- β 1.(29) TGF- β 1 contribue à la progression de la SVA en étant responsable de l'initiation de la calcification des cellulaires valvulaires aortiques interstitielles.(24) Wypasek et al.(30) a démontré que le degré de sévérité de la calcification des valves dans la SVA est associé avec le nombre de mastocytes présents. La présence des mastocytes activés dans les valves sténosées inflammées contribue à la sévérité de la calcification et de la minéralisation des valves. Ceci a comme conséquence une augmentation du gradient transvalvulaire et une diminution de l'aire d'ouverture de la valve aortique.(30) Le gradient transvalvulaire permet de déterminer le degré d'obstruction en

définissant la différence entre la pression proximale et distale par rapport à l'orifice de la valve.(31)

1.1.6.2.1. **Néoangiogenèse**

Les valves saines sont normalement avasculaires, mais des examens histologiques de la valve aortique malade suggèrent que l'inflammation est maintenue par la présence d'un processus de néoangiogenèse.(9) De minces vaisseaux nouvellement formés sont régulièrement observés dans les régions entourant les dépôts calciques avec une forte activité inflammatoire où se retrouve une forte densité des lymphocytes T. L'expression des molécules d'adhésion intercellulaires de type 1 et des molécules d'adhésion de cellules vasculaires de type 1 est augmentée dans ces vaisseaux sanguins. Ceci peut suggérer que ces vaisseaux donnent accès aux cellules inflammatoires au sein de la valve. Les hémorragies reliées à ces vaisseaux semblent importantes et sont présentes chez 78% des patients avec une SVA sévère. De plus, elles sont associées à l'infiltration des macrophages et une accélération de la progression de la maladie.(32) Dans les valves calcifiées, il est possible de trouver des microvaisseaux et des artérioles.(33) Cette néovascularisation des valves est stimulée par la relâche des facteurs pro-angiogéniques par les cellules inflammatoires et la diminution des inhibiteurs d'angiogenèse tels que l'endostatine et la chondromoduline-I.(33) Des études *in vitro* ont démontré que les mastocytes produisent des facteurs qui stimulent la sécrétion de VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) par les myofibroblastes pour augmenter le niveau local de facteurs pro-angiogéniques.(15, 33) L'angiogenèse peut stimuler la calcification par le transport des ostéoprogéniteurs et peut aider à induire la différenciation ostéogénique.(34)

1.1.6.3. **Fibrose**

La progression de la SVA est caractérisée par un épaissement extensif de la valve causé par l'accumulation des tissus fibreux et du remodelage de la matrice extracellulaire. L'activité inflammatoire peut activer une sous-population de CIVs dans la valve qui va se différencier en myofibroblastes. Ces myofibroblastes se retrouvent en abondance dans les couches internes de la valve. Les myofibroblastes sont probablement responsables de l'accélération de la fibrose lors de l'inflammation.(9) Les myofibroblastes et les cellules

inflammatoires sécrètent des MMP et des cathepsines qui jouent un rôle complexe et important dans le remodelage de la matrice des feuillets de la valve.

L'expression des MMPs-2/3/7/9/13 et des TIMP-1/2 est augmentée dans les valves malades.(35) Les MMPs sont des endopeptidases dépendantes du zinc responsables de la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. L'activation des MMPs (-1, -2, -3 et -9) et des cathepsines (S, K, V et G) peut amorcer la dégradation du collagène et de l'élastine pour former des peptides pro-inflammatoires et pro-calcifiants qui nuisent à l'intégrité de la matrice extracellulaire de la valve, augmente la réponse inflammatoire et l'expansion des nodules calcifiés.(15) En effet, les fragments de collagène issus de la dégradation du collagène par les protéases mentionnées plus haut peuvent stimuler la sécrétion d'IL-1 β par les monocytes.(36, 37) La MMP-1 se co-localise avec le TNF- α et, selon Kaden et al.(38), l'activation des leucocytes par le TNF- α pourrait stimuler la prolifération des CIVs ayant un phénotype de myofibroblaste et la sécrétion de MMPs qui contrôlent activement le remodelage de la matrice extracellulaire des valves aortiques calcifiées. La MMP-12 contribue à la minéralisation active des valves en dégradant les fibres d'élastine. Le dépôt de calcium va pouvoir se déposer sur ces fragments d'élastine qui contribueraient aussi à l'activation de la transdifférenciation des CIVs en un phénotype ostéogénique.(39)

Les cathepsines S, K et V sont des enzymes qui jouent un rôle dans la dégradation de la matrice, la réponse inflammatoire et sont présentes dans les zones calcifiées de la valve.(2) L'expression de la cathepsine S est surtout située dans les régions de calcification sévères. La cathepsine V est exprimée dans les cellules endothéliales dans les zones riches en néovascularisation. La cathepsine K est une protéase impliquée dans le remodelage de la matrice osseuse.(40) Une étude sur des souris qui n'expriment pas la cathepsine S démontre moins de calcification et une activité moins intense d'élastinolyse et d'inflammation comparé aux souris qui surexpriment la cathepsine S.(41) De plus, dans les valves inflammées, la cathepsine S produite par les macrophages dégrade l'élastine constituant la matrice extracellulaire ce qui génère des fragments d'élastine biologiquement actifs (matrikines) et des facteurs proinflammatoires spécifiques à l'urémie.(41) Ces produits attirent des macrophages qui vont sécréter plus de protéases. La réaction inflammatoire augmente l'expression de TGF- β 1 qui va favoriser la transition ostéogénique des myofibroblastes.(41, 42)

Les CIVs de phénotype myofibroblastique sécrètent du collagène, de l'acide hyaluronique et d'autres composants de la matrice extracellulaires qui vont se déposer de façon désorganisée.(43) Cela va altérer les propriétés biomécaniques de la valve qui deviendront plus rigide. Cette rigidité est une des causes de transdifférenciation des CIVs en un phénotype ostéoclastique.(15) (Figure 2)

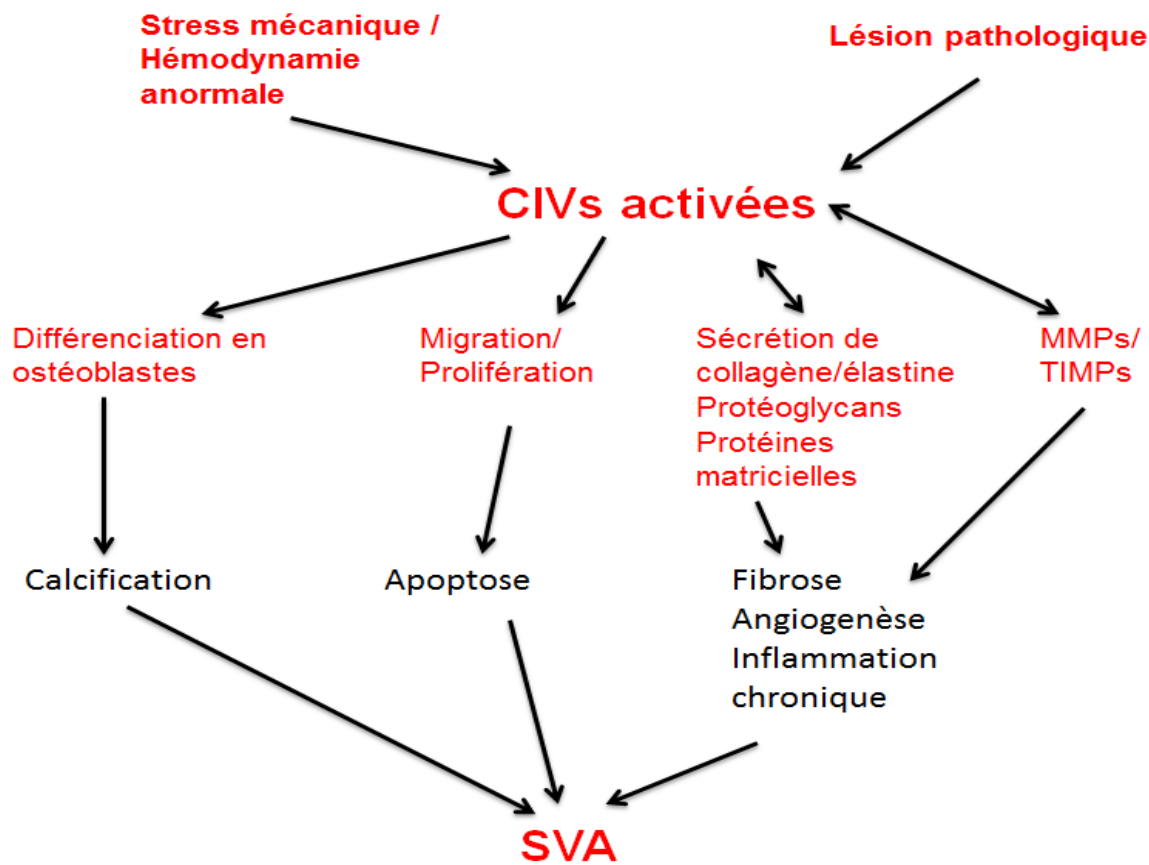


Figure 2. Résumé des rôles des cellules interstitielles de valves dans la pathogénèse de la SVA. CIVs : cellules interstitielles de valves; MMPs : métalloprotéinases matricielles; SVA : sténose valvulaire aortique; TIMPs : Inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases. Adapté de Liu, A.C. *et al.*, 2007.

Le TGF- β 1 semble jouer un rôle dans le processus de fibrose de la valve malade. Son niveau est augmenté dans les modèles expérimentaux de SVA et les tissus humains de valves dont le degré de fibrose est semblable à celle de la SVA.(24, 44) La ténascine-C est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire dont on retrouve une forte expression dans les valves calcifiées. Différentes études semblent indiquer que la ténascine-C aide à l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) et à l'expression des MMPs pour le dépôt de calcium dans les sites de lésions.(14, 45) L'expression de la ténascine-C est co-localisée avec l'expression de MMP-2 dans les valves calcifiées.(46)

La présence de cytokines pro-fibrotiques stimule la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes qui vont augmenter la sécrétion de collagène sous l'effet de l'angiotensine. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et l'angiotensine II sont tous les 2 régulées positivement dans la SVA et les récepteurs de l'angiotensine ont été identifiés sur les myofibroblastes de valves et pourraient modifier le processus de fibrose.(47)

1.1.6.4. **Calcification**

La calcification de la valve joue un rôle important dans le développement de la SVA. En effet, des dépôts hétérotopiques de calcium sont observés dans la valve malade.(48, 49) Durant le début de la pathogénèse de la sténose aortique, des régions microscopiques de calcification peuvent déjà être observées, co-localisées avec les dépôts de lipides. Ces régions de calcification sont composées de nodules contenant de l'hydroxyapatite déposée sur une matrice ressemblant à de l'os faits de collagène, d'ostéopontine et d'autres protéines de la matrice osseuse. Le remodelage de la calcification survient durant la progression de la SVA jusqu'aux étapes les plus avancées de la maladie où il est possible d'identifier de l'os compact, des microfractures et même des tissus hématopoïétiques dans la valve. La calcification débute dans le tissu valvulaire, proche des limites d'attachement.(9)

La progression de la calcification serait induite par la différenciation des myofibroblastes en ostéoblastes sous l'influence de plusieurs voies de signalisation pro-calcifiantes telles que celle de la caténine Wnt3-Lrp5- β , de l'ostéoprotégérine (OPG), du récepteur activateur du ligand du facteur nucléaire κ B de la voie de signalisation de RANK (RANKL) et de la voie de signalisation de Runx-2/Notch1. Une analyse de valves aortiques

calcifiées humaines par Shetty et al.(50) a montré une augmentation de l'expression de l'ostéocalcine, de l'ALP spécifique aux os, du CBFA-1 (*Core-binding factor a1*), de RANKL, de l'ostéopontine et de l'ostéonectine par rapport aux valves normales. Tous ces facteurs sont impliqués dans le processus d'ossification et le système RANKL/RANK-OPG semble jouer un rôle régulateur dans la calcification de la valve aortique humaine.

La calcification coordonnée par les ostéoblastes est un processus hautement régulé, semblable à la formation de nouveaux os dans lequel se retrouve une production locale de plusieurs facteurs habituellement associés au métabolisme des os du squelette. Ces facteurs sont l'ostéopontine, l'ostéocalcine, la sialoprotéine osseuse, l'ALP et la protéine morphogénétique osseuse 2. L'activation des cellules interstitielles valvulaires et leur transformation par différenciation en cellules semblables à des ostéoblastes ont été suggérées par Mohler et al.(51) comme étant des facteurs importants dans la calcification des valves.(52)

Une étude a démontré que la fétuine-A, une protéine multifonctionnelle sécrétée par le foie qui inhibe la dystrophie vasculaire et la calcification valvulaire, est réduite chez les patients atteints de SVA.(53)

La mutation de Notch1 a été rapportée pour son rôle dans la promotion de la différenciation des ostéoblastes.(54) La présence d'un Notch1 défectueux favorise la réponse pro-ostéogénique des cellules valvulaires aortiques interstitielles par l'activation des ERK1/2 et le facteur- κ B nucléaire d'activation.(55) Notch1 est un récepteur transmembranaire dont la voie de signalisation est impliquée dans la régulation de la différenciation osseuse durant le développement embryonnaire. Des études *in vitro* et *in vivo* chez des animaux montrent qu'il est impliqué dans le processus de calcification de la valve aortique.(56) Une perte de Notch1 contribue à la calcification de la valve aortique par un mécanisme dépendant de Sox9.(56) Une étude démontre qu'un défaut dans les premières étapes de développement de la valve aortique et une désinhibition tardive du dépôt de calcium dû aux mutations du gène Notch1 va engendrer une SVA progressive.(54) Le récepteur Notch1 normal joue habituellement un rôle important dans la prévention de la calcification des valves aortiques de l'adulte. Lorsqu'un ligand se lie à Notch1, suite à l'action d'une protéase, son domaine intracellulaire se sépare et translocalise dans le noyau pour inhiber le facteur de transcription d'ostéoblastes Runx2 par

l'intermédiaire de son action sur le *hairy-related family of transcription factors* (Hrt).(54, 57, 58) L'inhibition de Runx2 amène alors une baisse de la calcification. (Figure 3)

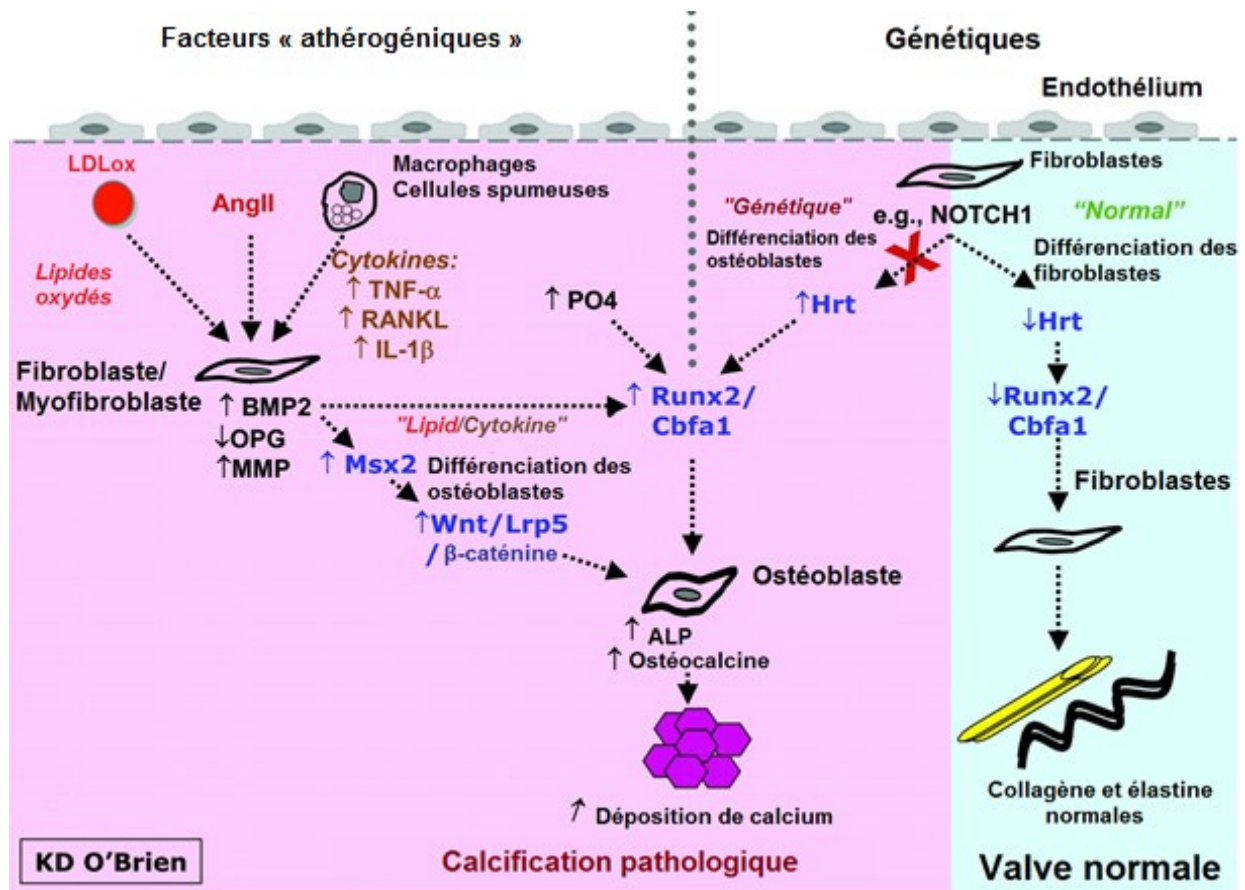


Figure 3. Représentation des interactions entre les lipides, l'inflammation et la génétique dans la pathogénèse de la calcification de la valve aortique. ALP : phosphatase alcaline; AngII : angiotensine II; Hrt : hairy-related family of transcription factors; LDLox : lipoprotéines oxydées de faible densité; MMP : métalloprotéinases matricielles; cellules interstitielles de valves. Adapté d'O'Brien, K.D., 2006.

Le stress intracellulaire oxydatif, un élément clé de l'inflammation, génère les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'ion superoxyde.(59) Miller et al.(60) ont été les premiers à prouver le rôle de ces DROs dans la pathogénèse de la SVAc (SVA calcifiée) par leurs effets pro-ostéogéniques à l'aide d'immunohistochimie de

tissus humains, d'histopathologie et de modèles murins pathologiques. Le H₂O₂ généré par le découplage de l'oxyde nitrique synthase joue un rôle vital de la maladie. L'étude a montré que les défenses enzymatiques contre le stress oxydatif sont à la baisse dans les valves aortiques calcifiées.(60) Le mécanisme se ferait par les cascades de signalisation pro-fibrotique et pro-ostéogénique des cellules vasculaires des muscles lisses *in vitro*.(61) Le H₂O₂ active les voies de signalisation Cbfa1/Runx2 et Msx2/Wnt qui stimulent la minéralisation dans les valves aortiques calcifiées humaines.(60) Les DROs agissent sur la microstructure des valvules par l'activation du mécanisme de la réponse de lésions de l'ADN (acide désoxyribonucléique). L'activation induit les cellules valvulaires interstitielles à se différencier en un phénotype ostéogénique avec l'aide des marqueurs d'expressions comme l'ostéopontine, l'ostéonectine, le *Runt-related transcription factor 2* et le *homeobox protein MSX-2*.(62, 63)

Les LDLox ont été démontrés pour jouer un rôle dans l'activation des processus de biominéralisation et de la signalisation ostéogénique vasculaire.(64, 65) Un niveau élevé de LDLox a été associé avec une réponse fibrocalcifique négative dans la SVAc.(59, 66) La voie de signalisation **Wnt** joue un rôle important dans la calcification artérielle et de la valve. Cette voie est importante pour tous les types d'os tels que les ostéoblastes qui forment les os, les ostéoclastes qui résorbent les os et les ostéocytes qui maintiennent les os.(44, 67)

1.1.7. Hypertrophie du ventricule gauche

La progression avancée de la SVA chez les patients va causer une augmentation de la pression postcharge. La pression postcharge est définie par la tension développée dans le mur du ventricule gauche pour permettre au cœur d'éjecter le sang.(9) L'augmentation de la pression sur la paroi ventriculaire va engendrer l'hypertrophie du myocarde du ventricule gauche. Les patients atteints de la SVA présentent différentes réponses telles qu'une augmentation de la taille des myocytes et une épaissement de la paroi ventriculaire face à l'hypertrophie pour préserver l'intégrité du ventricule gauche.(9) Cioffi et al.(68) démontrent que ces variations de la réponse hypertrophique peuvent être utilisées pour établir un pronostic. Cette caractéristique permettrait d'expliquer la différence entre le début des symptômes et la sévérité du rétrécissement de l'aire de la valve observée.(9)

Des échocardiographies et l'imagerie par résonance magnétique confirme que la variation du degré de l'hypertrophie ventriculaire gauche dépend faiblement de la sévérité de la diminution de l'aire de la valve aortique.(9, 69) La réponse de l'hypertrophie ventriculaire semble plutôt être associée avec l'âge avancé, le sexe masculin, l'obésité et au polymorphisme du gène ACE1/D.(9, 70, 71) Cette augmentation de la masse du ventricule gauche et la prévalence de l'hypertrophie a été démontré par l'étude SEAS (Simvastatine et Ezetimibe dans la sténose aortique) comme étant associée à l'hypertension présente chez les patients atteint de la SVA.(72) Les résultats du SEAS indiquent aussi que l'augmentation de la rigidité artérielle contribue à augmenter la postcharge et à la dysfonction du ventricule gauche chez les patients âgés qui souffrent aussi d'athérosclérose, de diabètes et d'hypertension.(73)

La transition de l'hypertrophie du ventricule gauche vers la défaillance du cœur gauche est caractérisée par l'apoptose des myocytes et la fibrose.(74) La mort myocytaire observée dans l'hypertrophie est due à l'augmentation de la demande en oxygène du myocarde dans la SVA provoquée par l'augmentation de la taille des myocytes et de la post-charge et au réseau de vaisseaux sanguins qui ne répond pas à la demande .(9) Les sites d'apoptose des myocytes sont co-localisés avec les zones de fibres qui seraient des signes de cicatrisation de lésions produits par la mort des myocytes. La cicatrisation présente est causée par le débalancement de l'activité des MMPs et des TIMPs, l'infiltration des myofibroblastes dans le myocarde qui ont secrété des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène de type I et III.(9, 75) Le processus de fibrose présent dans l'hypertrophie en combinaison avec l'arythmie joueraient un rôle dans la défaillance du cœur.(76)

1.1.8. Modèles *in vivo* de la SVA

Les études sur la SVA nécessitent des modèles animaux expérimentaux pour mieux comprendre la pathogénèse de la maladie. Un niveau élevé de LDL dans des modèles animaux ainsi que le vieillissement sont capables de reproduire des aspects importants retrouvés dans la SVA humaine. Les modèles de souris et de lapins hypercholestérolémiques possèdent des valves aortiques qui présentent des feuillets épaissis avec des lésions sous-endothéliales riches en macrophages au début de la pathologie avec une calcification progressive.(77-80) Des modèles de souris hypercholestérolémiques telles que les souris *ApoE^{-/-}* (apolipoprotéine E) et

les souris *Ldlr*^{-/-} (récepteur LDL) ont démontré de la calcification de la valve aortique dans les conditions décrites plus bas.(81-83) Les modèles animaux développés permettent de mieux caractériser la SVA et sont utiles pour les essais pré-cliniques de nouvelles thérapie. Cependant, chacun de ces modèles animales ne reproduit pas tous les aspects pathologiques humains. Chaque modèle utilisé permet de comprendre un peu plus les différents mécanismes présents durant la pathogénèse.(84)

1.1.8.1. Souris *Ldlr*^{-/-}

Le modèle de souris déficiente du gène *Ldlr* est une souris transgénique hyperlipidémique utilisée dans les études sur l'athérosclérose.(85) Weiss et al.(81) ont étudié le modèle de souris hypercholestérolémique déficiente en récepteur LDL et surexprimant l'apolipoprotéine B de souris (*Ldlr*^{-/-};Tg(*ApoB*^{100/100})) qui sont sujettes à développer de la calcification et du stress oxydatif dans la valve aortique avec l'âge et dont la version de la SVAC est proche de la version humaine. Les souris *Ldlr*^{-/-};Tg(*ApoB*^{100/100}) soumises à une diète normale ont été étudiées à l'âge de 20 mois. Les données échocardiographiques ont démontré une diminution de l'AVA de 75%, une augmentation de la masse du ventricule gauche et une diminution de la fraction d'éjection. Les données histologiques ont montré de la calcification et la présence de superoxydes en grande quantité chez les souris avec une SVA.

Miller et al.(86) a utilisé le modèle de souris Reversa (*Ldlr*^{-/-}/*ApoB*^{100/100}/*Mttp*^{fl/fl}/Tg(Mx1-Cre)) pour étudier les effets d'un traitement hypolipidémique sur la progression de la SVA. Les mutations qui inactivent le gène de la protéine de transfert des triglycérides microsomaux (*Mttp*) et celui du transgène de l'interféron-inductible Mx1-Cre permettent d'inactiver l'hypercholestérolémie sévère chez les souris. Le gène *Mttp* est important dans la production des lipoprotéines contenant de l'apoB. Son inactivation réduit énormément la sécrétion de l'apoB.(86) En réduisant le niveau de cholestérol après 6 mois durant les débuts de la SVA, ils ont démontré qu'il y a un arrêt de la progression dans la réduction de la mobilité des valvules et de l'AVA ainsi qu'une suppression de la voie de signalisation pro-ostéogénique. Une autre de leur étude a démontré que la progression de la maladie est un processus dynamique pouvant être modifié par des traitements même en présence d'une SVA avancée.(44) Un biais possible du modèle de souris Reversa est que

l'injection d'acide polyinosinique-polycytidylique afin d'induire la recombinaison Cre stimule la réponse immunitaire par une production immédiate d'interférons chez la souris. Cette relâche d'interférons amène une augmentation du niveau de lipides au début du traitement.(87)

Drolet et al.(88) ont étudié la fonction et la morphologie de la valve aortique des souris *Ldlr*^{-/-} traitées avec une diète enrichie de gras et de carbohydrates pendant 4 mois. L'échocardiographie indique des débuts de signes de la SVA par une diminution de l'AVA et une vitesse transvalvulaire plus grande. La diète, combinée à des facteurs athérogéniques comme l'obésité, la dyslipidémie et l'hyperglycémie contribuent à la SVA. Le développement de la SVA serait multifactoriel et l'hypercholestérolémie ne doit pas être la seule cible thérapeutique de la maladie.(88)

Le modèle de souris *Ldlr*^{-/-} a déjà été utilisé pour évaluer de nouvelles pistes de stratégies de traitements. L'effet à long terme athéroprotecteur du transport inverse du cholestérol de l'apoA-I humaine (apolipoprotéine A-I) sur la SVA a été étudié chez des souris transgéniques qui expriment seulement de l'apoA-I humaine sans interférence avec la version endogène de la souris et qui est déficiente en *Ldlr*. Ces souris avec un niveau élevé d'apoA-I humaine présentaient 6 fois moins de sites de lésions dans la valve du cœur comparé aux groupes de souris *knockout Ldlr* avec ou sans une expression normale d'apoA-I de souris après 36 semaines de diète riche e23n gras.(89)

1.1.8.2. Souris *ApoE*^{-/-}

Le modèle génétique de souris dyslipidémiques déficientes en apolipoprotéine E (*ApoE*^{-/-}) a été utilisé par l'équipe de Tanaka et al.(82) pour étudier le rôle des lipides dans la SVA. Les souris *ApoE*^{-/-} nourries avec une diète normale chow étaient étudiées entre l'âge de 9 à 115 semaines. Ce modèle de souris développe des aspects de l'inflammation similaires à la version humaine. Les valves sténosées des souris *ApoE*^{-/-} présentent de fréquentes apoptoses cellulaires, l'expression de chimiokines inflammatoires et des nodules de calcification. Une régurgitation modérée a été détectée par échographie chez une souris vieille de 103 semaines. L'étude démontre que des cellules provenant de la moelle osseuse étaient mobilisées et recrutées aux sites de lésions des valves malades pour le remodelage.

Une étude d'Aikawa et al.(90) sur l'utilisation de techniques d'imagerie moléculaire chez des souris *ApoE^{-/-}* a permis la visualisation des éléments clés des processus cellulaires présents au début de la SVA tels que la calcification, l'activité protéolytique et l'activation des macrophages et des cellules endothéliales. Les souris *ApoE^{-/-}* âgées de 30 semaines qui avaient reçu une diète athérogénique pendant 20 semaines exhibaient une valve aortique épaissie. Leurs résultats démontrent des similitudes entre la SVA et l'athérosclérose comme l'activation endothéliale en réponse aux forces mécaniques et aux LDLox, l'inflammation par l'activation des macrophages, l'activité protéolytique du remodelage de la matrice extracellulaires et l'ostéogénèse formant les nodules de calcifications.

L'angiographie d'une souris *ApoE^{-/-}* indique que le sexe masculin contribue à la progression de la régurgitation aortique. Les données histologiques indiquent que l'effet hyperlipidémique est additif avec le sexe masculin pour les dépôts lipidiques et à la sénescence vasculaire chez les vieilles souris.(91) Le modèle *ApoE^{-/-}* a démontré les rôles importants du TNF- α (92), de Nox1 dérivé des DROs (93) et de la protéine précurseur de l'amyloïde (94) dans la progression de la SVA.(95)

Ces souris transgéniques ont permis d'étudier l'effet de possibles traitements thérapeutiques. L'administration de la rosuvastatine et du chlorure de lithium ont été déjà testés et ont démontrés des effets anti-inflammatoires dans la valve aortique malade.(96, 97) Ces deux traitements ont réduit de façon significative l'accumulation des macrophages et l'expression de la molécule d'adhérence de cellules vasculaires de type 1. Un article sur l'effet d'une thérapie à partir d'infusions de l'apoA-I chez des souris *ApoE^{-/-}* montre des effets bénéfiques sur la SVA.(98) Les souris nourries avec une diète enrichie en cholestérol pendant 20 semaines pour le développement de la SVA ont reçu l'infusion du peptide mimétique apoA-I 3 fois par semaines pendant 4 semaines. Les données échocardiographiques et histologiques indiquent une baisse du remodelage de la valve aortique par une diminution du ratio de collagène de type I et III et une diminution de l'épaisseur de la racine aortique. Leurs analyses de simulation numérique et de modélisation 3D de la valve aortique confirment que de telles modifications peuvent expliquer l'augmentation de l'AVA et l'amélioration de la SVA.

1.1.8.3. **Le lapin blanc de Nouvelle-Zélande hypercholestérolémique**

La première mention du modèle d'un modèle de SVA chez le lapin avec calcification et atteinte significative de la fonction valvulaire aortique mesurée par échocardiographie a été fait en 2003 par Drolet et al.(99) Ce modèle permet de reproduire la SVA sans procédure invasive. Des lapins mâles blancs de Nouvelle-Zélande sont nourris avec une diète enrichie de 0,5% cholestérol et 50 000 IU par jour de vitamine D₂ dans l'eau de boisson. Dans l'étude effectué par Drolet et al.(99), les lapins soumis à la diète hypercholestérolémique supplémentée de vitamine D₂ ont développé de l'athérosclérose périphérique et la SVA. Un épaissement au niveau des feuillets de la valve aortique, une réduction de l'AVA et un gradient transvalvulaire augmenté de façon significative sont observés par échocardiographie lorsque comparé au groupe contrôle.(99) L'ajout de la vitamine D₂ dans la diète enrichie de cholestérol permettrait d'accélérer et d'augmenter le processus de développement de la calcification.(99, 100) Des études sur des cochons et sur des lapins (101-103) ont montré que les métabolites en excès de la vitamine D₂ pouvaient endommager la paroi artérielle et induire un certain niveau de nécrose des muscles lisses dans la média des artères. Ces lésions augmentent l'intégration des particules de lipides sur la paroi des artères et favorisent l'accélération de l'athérosclérose. Les résultats indiquent que la présence de la vitamine D₂ dans la diète hyperlipidémique est nécessaire pour le développement de la calcification et d'une SVA plus sévère que ce qui est observée avec une diète enrichie en cholestérol seule.

Un désavantage du modèle est la création artificielle de la SVA dans des conditions d'hypercholestérolémie extrême avec de la vitamine D₂ qui n'est pas retrouvée chez l'humain. Il est impossible d'étudier la physiopathologie de la SVA sur la valve et les stratégies possibles pour la prévention ou le ralentissement de la maladie. Cependant, la méthode non invasive utilisée pour produire ce modèle animal permet d'étudier le début de la pathogenèse de la SVA reliée aux facteurs athérogéniques semblables à ceux impliqués dans la version humaine de la maladie.

Ce modèle de lapin hyperlipidémique est utile pour l'étude de nouveaux médicaments qui pourrait arrêter ou ralentir la progression de la SVA.(99) Ce modèle a été utilisé au sein de notre laboratoire par Busseuil et al.(80) La diète a été administrée jusqu'à l'apparition d'une SVA significative définie par une diminution d'au moins 10% de l'AVA ou du ratio de la

vélocité transvavulaire par échocardiographie. L'étude a évalué la thérapie par infusion de peptide mimétique de l'apoA-1. Une régression de la SVA démontrée par une augmentation de l'AVA et une réduction significative de l'épaisseur des feuillets de la valve aortique a été observée.

1.1.9. Stratégies de traitements et de thérapies

À ce jour, il n'y pas de traitement efficace non invasif pour la SVA. Il est urgent de trouver rapidement des traitements médicaux efficaces afin de réduire le besoin de recourir aux chirurgies invasives. De plus, la grande majorité des patients sont très âgés et leur santé n'est pas propice à subir des chirurgies de cette envergure. Les stratégies de thérapies en cours de recherche se basent sur la similarité entre les pathogénèses de la SVA et d'autres maladies telles que l'athérosclérose, l'hypertension ou l'ostéoporose.

1.1.9.1. Remplacement de la valve aortique

Le remplacement de la valve aortique (**RVA**) est le principal traitement chez les patients qui sont atteints d'une SVA sévère. Cependant, ce ne sont pas tous les patients qui sont éligibles pour cette opération parce qu'ils souffrent de plusieurs comorbidités.(2) Il existe différents types de valves de remplacements. La valve mécanique, plus durable, nécessite un traitement constant aux anticoagulants à cause des risques de thrombose et d'embolie dans le système.(104) Les valves bioprothétiques ont une fonction hydrodynamique similaire à une valve aortique naturelle, mais ils ont une courte durée de vie à cause de la dégénérescence de la valve artificielle.(104) Les valves bioprothétiques disponibles sont des valves provenant d'un animal (des hétéogreffes porcines et des hétéogreffes bovines péricardiales) ou une homogreffe.(105) Les RVA utilisés pour le traitement de la SVA représentent 50% des opérations sur les valves cardiaques en Amérique du Nord.(106) Ces chirurgies utilisent plus les valves bioprothétiques comparé aux valves mécaniques.(107)

Les chirurgies pour un remplacement de la valve sont associées avec un risque de mortalité lié à l'opération de 1-3% chez les patients âgés de moins de 70 ans et de 3-5% chez les patients plus âgés. Les risques individuels varient largement selon l'âge, les comorbidités et les procédures effectuées simultanément sur le patient.(108) Ils dépendent aussi de l'habilité

et de l'expérience du chirurgien.(105) Les comorbidités associées avec une mortalité après 30 jours incluent l'âge, la dysfonction du ventricule gauche, les maladies cardiovasculaires associées, les pontages aorto-coronariens précédents, une insuffisance rénale et les maladies pulmonaires chroniques.(105) Des cotes de risques tels que l'EuroScore et celui de la *Society of Thoracic Surgeons* permettent d'évaluer les risques de mortalité associés à ces chirurgies chez les patients. Cependant, les scores obtenus ne sont pas optimaux parce qu'ils ne tiennent pas compte de facteurs importants comme la fragilité du patient.(105) Les indications pour les RVA sont claires pour les patients qui présentent les symptômes de la SVA, mais pour les patients souffrant d'une SVA asymptomatique où il est plus difficile de recommander un RVA.(105, 109, 110)

L'implantation de valve aortique par cathéter (TAVI) est une méthode alternative récente pour certains patients et cette technologie a le potentiel d'améliorer leurs symptômes et de prolonger leur espérance de vie.(105) La *Food et Drug Administration* (FDA) a approuvé ce traitement aux États-Unis en 2011 pour les patients inopérables et à très hauts risques suite aux essais cliniques du programme PARTNER (Placement of AoRtic TraNscathetER Valves/Mise en place de valves aortiques transcathéters).(111, 112) En ce qui concerne le choix entre le TAVI ou le RVA chez les patients à hauts risques chirurgicaux, il faut balancer les risques importants de saignement et de fibrillation atriale avec la chirurgie contre les risques possibles d'infarctus et de dommages vasculaires avec le TAVI.(112) Le plus grand avantage du TAVI est que la valve est posée de façon percutanée par-dessus la valve native sans avoir besoin de faire une opération à cœur ouvert et un pontage cardio-pulmonaire. Le TAVI est une opération non-invasive qui est dépendante des techniques d'imagerie comme l'échocardiographie transoesphageal et l'échographie transthoracique. Il reste cependant encore beaucoup de complications qui ont besoin d'être résolues avant que le TAVI puisse être considéré comme chirurgie intéressante chez les patients à faible risque. Ces complications possibles sont les fuites paravalvulaires, la migration du stent, des complications vasculaires majeures, des troubles de conductance et des infarctus.(104)

1.1.9.2. **Thérapies par les statines**

La SVA partage plusieurs facteurs de risque communs avec l'athérosclérose. De plus, la progression de la pathologie est semblable pour les deux. Elles sont caractérisées par des lésions endothéliales progressant par des dépôts de lipides, de l'angiogenèse et de l'inflammation active.(9) Les statines (inhibiteurs de la HMG-CoA réductase) sont des médicaments utilisés pour réduire le taux de cholestérol, particulièrement les LDLs. Elles possèdent des effets anti-inflammatoires et un article a prouvé qu'elles étaient bénéfiques chez les patients sans hyperlipidémie qui ont un niveau élevé de la protéine C-réactive.(113) La thérapie par les statines chez les patients atteints d'athérosclérose est utilisée pour ralentir la progression des plaques d'athérome dans les artères coronaires et de la carotide afin de réduire les événements cardiaques néfastes.(9) Le traitement aux statines pourrait donc permettre en théorie de prévenir le dépôt de lipides dans les artères, l'inflammation dans la SVA et de ralentir le rétrécissement de l'AVA.

Le moment où débute la SVA, lorsque la valve commence à se rigidifier et qu'il n'y a pas encore d'obstruction de la circulation sanguine, serait propice à l'administration de statines afin de ralentir la progression de la pathologie valvulaire. Une étude rétrospective d'Ardehali et al.(114) sur une cohorte de 1689 patients avec la sclérose de la valve aortique, soit un épaissement des feuillets sans atteinte hémodynamique significative, indique que l'utilisation des statines était associée avec des résultats cliniques positifs significatifs reflétés par une diminution de la mortalité liée aux maladies cardiovasculaire et une diminution des risques de la progression de la sclérose valvulaire aortique vers la SVA. Une autre étude provenant du *Heart and Soul Study* de Shah et al.(115) indique une augmentation du taux d'infarctus du myocarde chez les patients atteints de SVA lorsque comparé aux contrôles avec des valves normales. En ajoutant le facteur d'utilisation de statines, la différence est devenue non-significative. Les multiples études rétrospectives sur l'impact de l'utilisation de la statine sur la progression de la SVA ont donné des résultats conflictuels entre eux. Différentes études avec de petites cohortes de 65 à 211 patients ont démontré une tendance statistiquement significative pour une progression ralentie de la SVA avec l'utilisation de statines.(116-121) Une étude rétrospective avec une cohorte de 1257 sujets a eu des résultats contraires.(122) Les différentes analyses indiquent que la statine n'avait aucun effet significatif sur le taux de

changement de Vmax. L'étude de Bellamy et al.(120) sur l'analyse des patients atteints de la SVA a montré que c'est la statine et non le niveau de LDL qui affectait la progression de la SVA en ralentissant la pathologie.

L'inconsistance des résultats provenant des différentes investigations sur la thérapie à base de statines et les études rétrospectives plus récentes ont démontré que la statine n'avait pas d'effet significatif pour ralentir la progression de la SA. Cette stratégie d'utiliser la statine pour le traitement de la SVA a donc été décevante. Trois études majeures prospectives randomisées et contrôlées, soit le SEAS (*Simvastatine andt Ezetimibe in Aortic Stenosis*), l'ASTRONOMER (*Aortic Stenosis Progression Observation : Measuring Effect of Rovustatin*) et le SALTIRE (*Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression*) n'ont pas réussi à démontrer que le traitement aux statines avait un impact positif sur la progression de la SVAc, qu'il pouvait promouvoir la régression ou améliorer les événements cliniques.(123-125) L'hypothèse de l'étude du SEAS est que la baisse agressive de lipide avec la simvastatine/ezetimibe réduirait les risques de maladies cardiovasculaires et le besoin de remplacement de la valve aortique chez les patients atteints de la SVA asymptomatique. L'étude a obtenu des résultats mitigés.(125, 126) Cette investigation était le plus grand essai contrôlé et aléatoire avec une cohorte de 1873 sujets avec une sténose aortique légère à modérée avec le suivi le plus long d'une durée de 4,4 ans. Les résultats obtenus ont révélé que l'utilisation de la simvastatine avec l'ezetimibe ne réduisait pas les événements cardiovasculaires néfastes de la SVA incluant ceux qui sont attribués aux dysfonctionnements valvulaires.(127) Le taux de remplacement de la valve aortique est similaire entre le groupe de patients soumis au traitement qui était de 28,3% et le groupe placebo qui est de 29,9%. Des résultats semblables ont été observés dans les différentes études sur la thérapie avec la rosuvastatine ou l'atorvastatine.(123-125, 128, 129) De plus, les différentes méta-analyses n'ont pas découvert d'améliorations significatives entre les sujets traités avec ou sans statines au niveau de la moyenne du gradient de la pression de la valve aortique, de l'AVA ou des résultats cliniques.(130-132)

Les différents résultats obtenus avec les statines démontrent donc que même si la SVA et l'athérosclérose partagent des aspects physiopathologiques communs, ils possèdent d'importantes différences dans la pathogénèse qui ont d'importantes répercussions dans les

traitements. Dans l'athérosclérose, l'inflammation et le dépôt de lipides sont responsables du développement et de la stabilité de la plaque lipidique dans l'artère. Les événements négatifs sont surtout reliés à la rupture de la plaque. Les bénéfices du traitement à la statine sont dus à l'augmentation de la stabilité de la plaque et à l'épaississement de la chape fibreuse. Contrairement à l'athérosclérose, c'est l'épaississement des feuillets et le rétrécissement progressif de l'aire de la valve aortique qui amènent les conséquences négatives de la SVA. Cette réduction de l'AVA est causée majoritairement par l'augmentation de la calcification. La statine n'aurait pas d'effets bénéfiques sur la calcification des artères coronaires dans les maladies cardiovasculaire athérosclérotiques.(133-135) Globalement, les résultats des différentes études suggèrent donc que l'utilisation de la statine pourrait être bénéfique pour le ralentissement de la progression de la SVA mais seulement au stade précoce de la maladie et donc bien avant l'apparition de symptômes.

1.1.9.3. **Thérapies par HDL**

Une étude indique que la quantité d'apolipoprotéine A-I provenant des HDL (lipoprotéines de haute densité), qui ont possiblement un effet athéroprotecteur chez la valve aortique, diminue dans les valves aortiques humaines calcifiées.(15) Ces HDLs deviendraient dysfonctionnels dû à la diminution de l'activité de la paraxonase-1, une enzyme antioxydante associée aux HDLs.(136, 137) Des données épidémiologiques ont associé l'accélération de la progression de la SVA avec un faible niveau du HDL-cholestérol et un ratio élevé du cholestérol total sur le HDL-cholestérol.(121, 138). Il y aurait donc une possibilité que le transport inverse du cholestérol dysfonctionnel soit une cible thérapeutique. Des études ont confirmé l'effet positif des thérapies par les HDL et par les peptides mimétiques de l'apoA-I sur l'athérosclérose.(136, 139-141) Les HDL sont des lipoprotéines avec des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-apoptiques, anti-thrombotiques et qui favorisent le transport inverse du cholestérol, c'est-à-dire, le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, où il peut être excrété via la bile.(140, 142)

L'étude de Busseuil et al.(80) a démontré que l'infusion d'un peptide mimétique de l'apoA-I dans un modèle de la SVA chez le lapin hypercholestérolémique a permis de faire régresser la pathologie. L'apoA-I est une composante protéique majeure des HDL et

responsable de plusieurs des effets positifs des HDL.(140) Une autre étude sur la protéine recombinante apoA-I Milano administrée dans un modèle expérimental SVA chez le lapin a montré les bienfaits de ce traitement.(143) La courte infusion d'apoA-I Milano a permis la régression morphologique et histopathologique de la valve aortique malade. Un effet bénéfique significatif est observé par la baisse de la vitesse maximale du jet sanguin provenant du ventricule gauche et une augmentation de l'AVA par rapport au groupe placebo. Il y a eu aussi une réduction significative de l'épaississement des valvules aortiques, de l'inflammation et de la calcification.(143) Une étude plus récente sur des modèles de souris a montré que l'infusion de l'apoA-I mimétique empêche la minéralisation de la valve et pouvait faire régresser la SVAc au début de son développement.(98) Ces études *in vivo* semblent indiquer que les thérapies ciblant les HDL sont potentiellement pertinentes pour le traitement de la SVAc. Cependant, le rôle des HDLs sur la pathogénèse n'est pas très bien compris et il serait intéressant de tester leurs effets dans un modèle de SVA de stade plus avancé de la pathologie.

1.1.9.4. **Thérapies par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine**

L'hypertension cause des problèmes similaires à la sténose aortique est elle-même un facteur de risque de la SVA. Elle est caractérisée par une augmentation de la pression postcharge et par l'hypertrophie du ventricule gauche sous l'influence du système rénine-angiotensine-aldostérone.(9) Des études chez des patients atteints de maladies cardiaques hypertensives ont obtenu des résultats qui indiquaient que l'administration d'inhibiteurs de l'ECA tel que le lisinopril (144), le fosinopril (145), le ramipril (146) et le quinapril (147), ou de bloqueurs du récepteur de l'angiotensine tels que l'iosartan (148) avaient réduit l'hypertrophie du ventricule gauche en même temps qu'ils ont diminué la pression sanguine. Cela a eu des effets positifs sur la fibrose myocardique, la fonction diastolique et d'autres issues cliniques.(9)

Les effets d'inhibiteur de l'ECA et des bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine dans la SVA ne sont pas trop bien connus. Des études ont observés dans les modèles expérimentaux de sténose aortique chez les rats traités avec ces médicaments une amélioration de leur survie

et de leur fonction cardiaque.(145-147) Une étude expérimentale chez des lapins avec SVA induite par la vitamine D a montré les effets bénéfiques du traitement par le ramipril.(149) Cette drogue a retardé le développement de la SVA en réduisant l'accumulation dans la valve de protéines qui inhibent la thiorédoxine et en limitant la dysfonction endothéliale chez les lapins atteints d'une SVA peu sévère.

Deux études rétrospectives chez l'humain ont démontré des résultats contradictoires de l'impact du traitement sur la progression de la SVA. L'étude rétrospective d'O'Brien et al. (150) indique une association significative entre les inhibiteurs de l'ECA et le faible taux d'accumulation de calcium dans la valve aortique. L'article de Rosenhek et al.(118) n'a pas trouvé d'effet suite à l'administration d'inhibiteurs de l'ECA quant à la progression de la SVA. Cependant, une publication par Nadir et al.(151) a observé des effets positifs chez des patients atteints de la SVA qui ont reçu une thérapie par les inhibiteurs de l'ECA et des bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine. L'étude observationnelle indique que les patients traités avec la thérapie avaient une réduction du risque de mortalité et d'évènements cardiovasculaires négatifs. Des études publiées ont suggérés que l'administration d'inhibiteurs de l'ECA est bien tolérée chez les patients atteints d'un stade avancé de la SVA.(152, 153) Des études prospectives contrôlées et randomisées à hautes échelles avec cette stratégie de traitement serait utile pour la validation des résultats.(154)

1.1.9.5. **Traitement de la calcification et de l'ostéoporose**

La calcification joue un rôle important dans la progression de la SVA et le rétrécissement de la valve aortique. Une étude avec des patients atteints d'ostéoporose indique qu'il y a une augmentation des incidences de la SA et qu'il y a un taux plus rapide de la progression de la maladie. La densité minérale osseuse est associée négativement avec la calcification des valves aortiques chez les patients atteints de l'ostéoporose.(9, 155) La SVA et l'ostéoporose sont deux pathologies caractérisées par des anomalies dans le métabolisme du calcium.

Le métabolisme du calcium est contrôlé grâce aux ostéoblastes et aux ostéoclastes.(156) Le système OPG/RANK/RANKL semble avoir un rôle important dans l'ostéoporose et la SVA. L'OPG est un récepteur pour RANKL, une molécule stimulant la

différenciation des ostéoclastes et la résorption osseuse.(157) Les patients atteints d'ostéoporose ont une augmentation de l'expression de RANKL et une réduction du niveau de l'OPG. Cette particularité a été la base de développement d'un anticorps monoclonal anti-RANKL du nom de denosumab. Le traitement de l'ostéoporose avec le denosumab est très efficace et très bien toléré chez des femmes âgées entre 60 à 90 ans.(158) L'augmentation de l'expression de RANKL et la baisse de l'OPG ont été aussi observé dans les valves aortiques sténosées calcifiées.(159) Une étude de Bucay et al.(160) sur des souris OPG^{-/-} adolescentes et adultes affichent une diminution de la densité totale osseuse marquée par des os trabéculaires et corticaux plus poreux, un amincissement remarqué des os pariétaux du crâne et une plus grande incidence de fractures. Ces souris présentent une calcification vasculaire largement répandue située au niveau de l'aorte et des artères rénales. Une piste intéressante pour le traitement de la SVAc serait la régulation de l'OPG ou de sa voie de signalisation qui associerait l'ostéoporose avec la calcification vasculaire.

Les similarités entre l'ostéoporose et la calcification dans la SVA justifient l'utilisation de drogues comme les bisphosphonates qui sont connus pour réduire la calcification vasculaire. Des rats traités avec de la warfarine et de vitamine D pour développer de la calcification artérielle et traités aux bisphosphonates (alendronate ou ibandronate) ont montré une inhibition de la calcification vasculaire.(161) Ces drogues ont démontrés leur capacité à réduire la calcification des valves chez des patients qui ont une insuffisance rénale et des valves bioprostétiques.(161, 162) Le système OPG/RANK/RANKL qui joue un rôle central dans la calcification serait donc une bonne cible de traitement avec des médicaments comme le denosumab pour des essais contrôlés randomisés chez des patients atteints de la SVA.(9)

1.2. *Phage display*

Le *phage display*, ou méthode de présentation de peptides à la surface de phages, est une technique de criblage à haut débit qui utilise une librairie hétérogène de phages modifiés génétiquement exprimant chacun à la surface du virion correspondant un peptide aléatoire afin de trouver des candidats qui possèdent la meilleure interaction peptide-protéine possible avec une cible donnée. Chacun de ces phages présents dans la librairie exprime une séquence unique de peptide à sa surface. Le processus de sélection par *phage display* est répété plusieurs

fois afin de trouver les meilleurs peptides candidates ayant les meilleures affinités avec la cible. Dans le cas qui nous intéresse, soit celui d'un criblage *in vivo*, la technique permet de découvrir de nouveaux peptides qui vont se lier aux marqueurs présents à la surface de tissus ou d'organes via la voie systémique.

1.2.1. Découverte par Dr George P. Smith du *phage display*

La technologie de *phage display* a été introduite pour la première fois en 1985 par George P. Smith.(163) L'inventeur de cette approche présente une méthode d'expression d'un fragment d'ADN étranger introduit dans le gène III d'un bactériophage (phage) filamenteux pour présenter une protéine de fusion à la surface du virus. Un bactériophage est un virus qui infecte spécifiquement des cellules bactériennes pour pouvoir se répliquer. La protéine de fusion est exprimée sous une forme bioactive accessible à la surface du phage qui garde sa capacité d'infection. Ces phages modifiés sont beaucoup plus enrichis par rapport aux phages ordinaires à la fin d'un processus de sélection.(163)

Depuis sa découverte, la technologie de *phage display* a été utilisée comme outil de criblage à haut débit d'interactions protéiques dans plusieurs domaines tels que l'immunologie, la biologie cellulaire, l'imagerie moléculaire, la découverte de nouvelles drogues, la pharmacologie, etc.(164-169) La technique de *phage display* a subi plusieurs modifications afin de répondre aux différents critères de sélection pour différentes cibles telles que des protéines purifiées ou des cellules. Son utilisation dans des expériences *in vivo* a permis la découverte de nouveaux ligands, récepteurs et marqueurs moléculaires.(166-168) Dans les dernières années, cette technique a été choisie comme méthode de criblage chez l'humain pour trouver des molécules surexprimées dans les différents cancers.(170, 171) Il existe une variété de phages qui ont été utilisés comme vecteur pour le *phage display*. Les phages T4, T7 et lambda ont été déjà utilisés dans des expériences de *phage display*.(172-174) Parmi les phages choisis comme vecteurs, le phage filamenteux M13 est le plus utilisé dans le système de *phage display*.

1.2.2. Biologie du phage

Les phages filamenteux (Ff) incluent les phages M13 et f1 et possèdent une apparence filamenteuse en forme de longue tige. Ils nécessitent le pilus F pour infecter leur hôte bactérien, l'*Escherichia coli* (*E.coli*).⁽¹⁷⁵⁾ Ces bactériophages sont membres de la famille *Inoviridae* du genre *Inovirus*.⁽¹⁶⁶⁾ D'une taille de 900 nm de long et d'une largeur de 7 nm, ces virus ont un génome composé d'un ADN (acide désoxyribonucléique) simple brin.⁽¹⁶⁷⁾

Ces virus sont non-lytiques, ce qui veut dire qu'ils se répliquent sans tuer l'hôte qu'ils infectent. Leur mode d'assemblage est différent des phages lytiques qui finissent de se répliquer dans le cytoplasme et les nouveaux virions sont alors libérés par la lyse de la cellule hôte. Les phages filamenteux se répliquent dans l'environnement périplasmique et sont alors sécrétés de façon continue de la cellule infectée sans tuer son hôte. Ce dernier devient alors une sorte d'usine de production du phage. La cellule bactérienne infectée ne meurt pas, mais subit une réduction de son taux de croissance étant donné que le phage s'est emparé de la machinerie bactérienne pour se répliquer.⁽¹⁶⁷⁾

Les phages filamenteux possèdent des caractéristiques différentes concernant leur mode de réplication et leur physiologie biologique par rapport aux autres types de phages. Les phages filamenteux ne peuvent se répliquer qu'en infectant les souches d'*E. coli* qui expriment le pilus F, une structure protéique bactérienne qui joue un rôle dans la transmission et le codage des informations génétiques de la bactérie durant sa réplication. Les conditions d'infection du Ff sont donc contrôlées. Concernant leur physiologie, les phages filamenteux sont résistants à des conditions extrêmes telles qu'un pH acide, une température élevée et les clivages enzymatiques.⁽¹⁶⁷⁾ Ils peuvent supporter un pH de 2,2 et de 4 à 6 mol/L d'urée sans perdre leur capacité d'infection, ce qui est une propriété exploitée dans les criblages *in vivo*.⁽¹⁷⁶⁾

1.2.2.1. Biologie du phage filamenteux M13

La souche virale M13 est le phage filamenteux habituellement utilisé comme plateforme pour l'expression des peptides pour le *phage display*.⁽¹⁶⁷⁾ Le phage M13 a son ADN enrobé par la protéine d'enveloppe majeure pVIII d'une taille de 50 acides aminés et qui est présente en 2 700 copies dans un phage mature. (Figure 4) La taille du génome du phage

M13 est de 6407 bp. Un seul gène, le gVIII, code la protéine pVIII. Ce phage filamenteux possède les protéines d'enveloppe mineures pIII et pVI à un bout et à l'autre extrémité se trouve les protéines pVII et pIX. Chacune de ces protéines d'enveloppe mineures est présente en 4 ou 5 copies sur le phage.(175) La protéine pIII est nécessaire afin que le phage puisse infecter la cellule bactérienne par l'adsorption au niveau du pilus F. Elle a aussi comme rôle de terminer l'assemblage des nouveaux phages et de stabiliser les particules virales.(175)

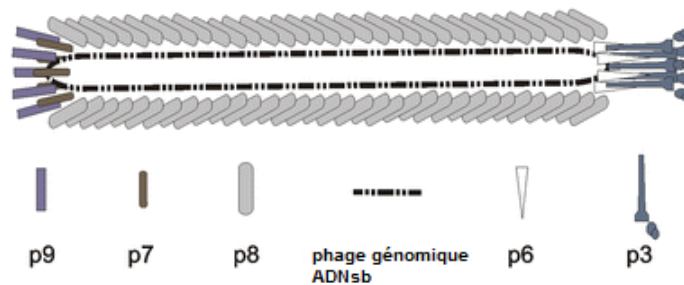


Figure 4 : La structure du phage filamenteux M13. Adapté de Bratkovič, T., 2010.

L'étape d'infection du cycle lysogénique commence lorsque la protéine pIII du phage s'attache au pilus F et permet au phage d'injecter son ADN simple brin dans le cytoplasme de la bactérie. Au cours de ce processus, les protéines pIII subissent un changement de conformation ce qui permet l'interaction avec le co-récepteur bactérien TolA, la dissociation de PIII et pVI et leur incorporation dans l'enveloppe cytoplasmique de l'hôte.(177) Le brin positif d'ADN génomique du phage va détourner les fonctions habituelles de la bactérie pour pouvoir synthétiser le brin complémentaire d'ADN. Les deux brins vont alors former un ADN double brins qui est la forme répliquative (FR). La FR est utilisée comme modèle pour la synthèse d'ARN (acide ribonucléique), de protéines, d'autres FRs et d'ADN simple brin qui seront utilisés pour la production des nouveaux phages.(178) Le génome du M13 possède deux régions codantes. La première a un promoteur puissant qui va lui permettre d'exprimer les protéines qui sont requises en grand nombre de copies telles que la protéine pVIII. La deuxième région va exprimer les protéines qui ne nécessitent qu'un petit nombre de copies par l'emploi d'un promoteur moins puissant.(175) Après la synthèse, les 5 protéines d'enveloppe sont insérées dans l'enveloppe cellulaire. À l'étape d'insertion dans la membrane intérieure,

les protéines pIII et pVIII restent ancrée à la membrane par des interactions hydrophobiques après s'être débarrassées de leurs peptides signal.(167)

Durant la réplication de M13, la protéine pII coupe le site ori dans le brin positif de l'ADN, ce qui va exposer l'extrémité 3' qui va servir de site d'initiation de la réplication par l'ADN polymérase. À la fin du cycle de réplication, la protéine pII va lier chacune des extrémités pour circulariser l'ADN. La production de FRs à partir de l'ADN simple brin continuent jusqu'à ce qu'il y ait un nombre suffisant de protéines pV qui soient exprimées.(167) Ensuite, il y a une accumulation de protéines produites par l'ADN simple brin sur le brin positif qui empêche la production des FRs. L'hydrolyse d'ATP permet la sécrétion de phages qui seront exportés à travers les canaux membranaires créés par le complexe pI et pIV. Durant cette transportation, la protéine pV va être remplacée par la protéine majeure d'enveloppe VIII et les autres protéines d'enveloppe mineures vont s'attacher à chaque bout sur le phage pour obtenir à la fin un bactériophage M13 complet.(179)

1.2.3. Principe de l'expression des peptides sur le phage

1.2.3.1. Types de phages utilisés

Il existe différents types de bactériophages qui ont déjà été utilisés dans les techniques de *phage display*. Les phages filamenteux, T7, T4 et lambda ont été choisis comme véhicules pour l'expression de bibliothèques. Parmi ces virus, le bactériophage filamenteux M13 est celui le plus utilisé et documenté dans la littérature.(167, 168, 175, 180-185) Chacun de ces phages possède des caractéristiques qui peuvent répondre à certains critères pour la sélection d'une cible donnée.

Le phage filamenteux M13

Le phage filamenteux M13 est le phage filamenteux le plus utilisé dans les systèmes de *phage display*. Des bibliothèques commerciales basées sur ce phage sont disponibles. Une caractéristique intéressante des phages filamenteux pour le *phage display* est que leurs conditions d'infection peuvent être contrôlées. Les phages filamenteux peuvent seulement infecter les souches bactériennes *E. coli* qui expriment le pilus F. De plus, le pilus F se

dépolymérise suite à l'infection, ce qui permet à une bactérie d'être infectée par un seul phage.(186) Cela est utile pour l'amplification des phages, car chaque bactérie infectée représente alors un clone de phage unique qui exprime un peptide ou un anticorps précis de la librairie. L'insertion de la protéine de fusion dans le génome M13 n'est pas trop limitée par sa taille. Les insertions de séquences peptidiques relativement larges vont simplement produire des phages plus longs. Leur résistance à des conditions extrêmes leur procure une bonne adaptation aux conditions de criblage *in vitro* et *in vivo*.

En choisissant sur quelle protéine d'enveloppe la protéine de fusion est exprimée, il est possible d'effectuer une sélection de haute affinité ou de haute avidité pour la cible choisie.(Voir section 1.2.3.3) Un des défauts du système de *phage display* avec le phage filamenteux est sa taille qui est plus grande que 500 nm. Cette taille peut nuire au phage lorsqu'il sort des vaisseaux sanguins de certains tissus. Dans un article de *phage display* sur la sélection des cellules parenchymateuses du foie, l'utilisation d'une librairie de phage basée sur le phage M13 n'était pas possible.(187) La petite taille de l'espace de Disse qui sépare les cellules du foie ne permet pas le passage d'un virus aussi gros. Ils ont dû utiliser une librairie basée sur le phage T7. L'assemblage de la particule de phage M13 est complété dans le périplasme de la bactérie et les protéines d'enveloppe sont exportées vers la membrane externe avant l'assemblage. Les protéines de fusions qui entravent cette exportation ne sont donc pas incluses dans la structure phagique.(188) Cette limite n'est pas présente chez les phages lytiques T4 ou lambda parce que l'assemblage du virus se fait dans le cytoplasme. Une étude sur la diversité des bibliothèques de peptides entre les phages M13 et les phages T7 mentionne des biais des peptides exprimés suites à l'amplification pour les phages M13.(189) Certains peptides qui possèdent des résidus de prolines ou thréonine ont un biais au niveau de l'amplification qui fait en sorte qu'ils ont de la facilité à se répliquer. La proline et la thréonine sont des acides aminés surreprésentés dans les bibliothèques de peptides de phages M13 ce qui avantage la propagation de ces phages.(180) Certains acides aminés ont l'effet contraire comme l'arginine, la cystéine, la glycine et la valine. Ces acides aminés causent des problèmes pour la stabilité de l'assemblage du phage mature.(189) Un autre article parle des peptides obtenus qui ne sont pas reliés à la cible (TUP : *Target unrelated peptide*) qui sont des résultats faux-positifs.(180) Certaines séquences peptidiques comme HAIYPRH peuvent facilement se

propager durant l'amplification et seront donc surreprésentées par rapport aux autres séquences.(180) L'étape de validation des peptides trouvés lors d'un criblage est donc très importante.

Le phage T4

Le bactériophage lytique T4 est formé d'une tête en forme d'icosaèdre et d'une queue. Il possède un génome formé d'ADN double brin d'une taille de 168 895 pb.(167) La tête est composée de trois protéines importantes: gp23, gp24 et gp20. La protéine gp23 est enrobée par deux protéines non essentielles dont l'absence ne va pas affecter la viabilité du phage T4.(190) La première est SOC, une petite protéine de capsid externe. L'autre protéine est le HOC (protéine de capsid externe hautement immunogénique). C'est la queue du phage qui est utilisée pour les interactions entre le phage T4 et son hôte durant l'infection. La queue sert aussi à injecter l'ADN dans le cytoplasme de la bactérie.(167)

Le système de *phage display* T4 utilise les protéines non-essentielles, HOC et SOC, pour l'expression des peptides à la surface de la capsid. Les 155 copies d'HOC et les 810 copies de SOC qui se lient avec une forte affinité aux phages matures, partagent les mêmes propriétés physiques. L'assemblage du phage T4 dans le cytoplasme de l'hôte bactérien permet la fusion de grands complexes protéiques à la surface du virus.(167) Les peptides de fusion peuvent se lier à la position C- ou N-terminale de HOC et SOC.(199)

Un des avantages du système de *phage display* avec le phage T4 est la présentation de peptides et de protéines complexes d'une grande taille, aussi large que 710kDa, pour un grand nombre de copies à la surface (191, 192). La possibilité de pouvoir exprimer des molécules aussi complexes sur la capsid du phage est avantageuse pour les sélections qui utilisent des procédures immunologiques. Il y a des réactions immunologiques qui nécessitent la protéine complète et non une partie de l'épitope seule ou des domaines choisis qui ne possèdent pas la structure repliée native qui pourrait omettre des épitopes conformationnels.(167)

Le phage T7

L'équipe de Rosenberg a développé une série de vecteurs de phages pour l'expression de peptides à la surface des phages T7.(185) Ces vecteurs sont maintenant commercialisés par la compagnie Novagen, Merck Biosciences. Ces bactériophages ont une tête de forme

icosaédrale avec une queue.(193) La petite queue du phage T7 est utilisée pour l'attachement à la bactérie.(167) Il possède un génome d'ADN double brin d'une taille de 39 937 pb enfermé à l'intérieur de 415 copies de la protéine de capsid de T7 codée par le gène 10.(167) La protéine de capsid gp10 située dans la tête est utilisée pour l'expression des peptides à la surface du phage. Un décalage naturel du cadre de lecture dans les gènes de gp10 va former deux protéines gp10. La protéine 10A qui a 344 acides aminés et la 10B qui a 397 acides aminés.(167) Dans le système de *phage display* de Novagen T7Select, c'est sur la surface d'une région de 10B qu'est exprimé le peptide. Le site du changement du cadre de lecture dans le gène de gp10 a été enlevé afin de permettre au vecteur d'exprimer un seul type de protéine de capsid. La fusion peptidique se fait au site de clonage multiple inséré dans la protéine 10B à la position de l'acide aminé 348.(167)

La compagnie Novagen offre commercialement 3 types de vecteurs de la librairie de phages T7Select. Le premier vecteur est le T7Select415 qui a la particularité de pouvoir exprimer des protéines pouvant avoir jusqu'à 50 acides aminés pour 415 copies par phages T7. Le deuxième vecteur est le T7Select10 qui peut avoir un nombre de copies moyen allant de 5 à 15 copies par phage pour des protéines d'une taille aussi grande que 1200 acides aminés. Le dernier vecteur disponible est le T7Select1 qui peut avoir de 0,1 à 1 copie par phage d'une protéine de 900 à 1200 acides aminés.(194)

Le phage T7 a des propriétés qui font de lui un choix intéressant comme vecteur de *phage display*. Étant donné que c'est un virus lytique, son cycle de vie permet un assemblage du phage dans le cytoplasme de la bactérie hôte. Le fait qu'il ne nécessite pas la sécrétion du phage par la membrane offre un plus grand éventail de choix de protéines de fusions qui peuvent être exprimées. De plus, cela enlève les limitations que possède le phage M13 pour exprimer à sa surface des protéines de fusions globulaires ou hydrophobiques.(167) Le cycle de vie plus court des phages T7 comparé aux phages filamenteux permet la formation des plaques de phages après 3 heures à 37 °C et la culture bactérienne infectée est lysée au bout de 1-2 heures.(195) Ceci a comme avantage de diminuer le temps nécessaire pour effectuer de multiples tours de sélection d'une expérience de *phage display*. Les bactériophages T7 sont résistants contre diverses conditions environnementales et peuvent endurer des conditions qui pourraient inactiver les autres phages.(167)

Le phage lambda

La structure du bactériophage lambda est composée d'une tête en forme d'icosaèdre, d'une queue et de fibres. Il possède un génome d'ADN double brin linéaire de 48 490 pb de long. La queue permet l'attachement du phage à la bactérie *E. coli* pour l'infection.(196) Le phage lambda est un virus qui peut entrer en mode lytique ou lysogénique pour la réplication.(197) En mode lysogénique, le génome du phage peut être intégré dans le chromosome bactérien et se propager avec l'hôte. L'état de l'hôte cellulaire se nomme alors lysogénie et le phage devient un prophage. Le prophage ne tue pas son hôte. Selon certaines conditions telles qu'un ADN endommagé du phage lambda, le cycle lysogénique peut se transformer en cycle lytique ce qui amène une énorme production de phages et la lyse cellulaire.(167)

Dans le système de *phage display* utilisant le phage lambda, la protéine majeure d'enveloppe gpD et la protéine de queue majeure gpV ont été utilisées pour l'expression des peptides.(185) La protéine gpD est surtout utilisée comme partenaire de fusion pour le plus grand taux d'expression pouvant atteindre 90% des 420 copies.(198) Il est possible d'effectuer des fusions à la position C-terminale ou N-terminale sans que cela n'affecte l'assemblage du phage, sa viabilité ou sa capacité d'infection. Grâce à la petite taille de gpD, les fusions faites aux positions C- et N-terminales sont accessibles pour interagir avec des ligands ou des récepteurs.(199) Pour les protéines beaucoup plus larges qui interfèrent avec la morphologie des phages, l'expression est faite dans un système de deux gènes. Cette stratégie utilise deux copies de gpD dans le génome du phage de façon à avoir un partenaire de fusion et l'autre qui reste de type sauvage. Cela réduit les inconvénients dus à la morphologie du phage et permet l'expression d'une centaine de copies de la protéine de fusion.

La fusion sur la protéine gpV a déjà été réalisée avec succès et a permis l'isolation d'anticorps spécifiques provenant d'une librairie d'anticorps du système de *phage display* du phage lambda. Cependant, ce système a quelques limites, par exemple un faible taux d'expression de la protéine de fusion à sa surface. Les fusions sur gpV donnent comme résultat l'expression d'une petite quantité de protéines recombinantes par le phage. De plus, le rendement de la récupération des phages est faible durant le processus de sélection. Toutefois, cet inconvénient peut être avantageux pour une librairie d'anticorps. Le faible nombre

d'anticorps exprimés obtenus à la fin de la sélection a davantage de chance de posséder une très grande affinité de liaison avec la cible.(172)

1.2.3.2. **Mode de présentation des peptides et types de vecteurs utilisés**

Le système de *phage display* du phage M13 utilise différents types de vecteurs afin de pouvoir exprimer un peptide à la surface du phage. Le mode de présentation des peptides de ces vecteurs varie selon le type et la forme exprimée de la protéine d'enveloppe utilisée. La librairie commerciale de *phage display* utilise le vecteur de type 3 pour la présentation des peptides.

Dans le vecteur type 3, le peptide d'intérêt est inséré en position N-terminale du gène pIII dans le génome du phage M13. Toutes les protéines pIII seront exprimées sous formes recombinantes et peuvent donc porter la protéine de fusion avec un taux d'expression élevé. Cependant, les protéines plus larges peuvent causer un problème en réduisant le taux d'infection du phage. Les grosses protéines créent des délais au niveau de l'assemblage du phage ce qui va perturber l'arrangement de la protéine pIII sur le phage. L'absence de la protéine pIII durant l'étape de l'assemblage du phage va engendrer la création de polyphages. Les polyphages sont des phages plus longs qui peuvent contenir 2 génomes ou plus. Les polyphages sont produits naturellement dans la population des phages filamenteux et représente environ 5% des phages produits.

Il existe aussi un autre vecteur similaire qui est le type 8. Dans ce système, il n'y a qu'un seul vecteur de phage qui contient un seul gène de la protéine pVIII fusionnée avec la séquence peptidique insérée. Donc, tous les phages produits dans le système 8 contiennent une protéine recombinante pVIII. Le système est habituellement utilisé pour les libraires de petits peptides d'un maximum de 8 acides aminés. L'expression de gros peptides fusionnés avec la protéine pVIII peut causer des problèmes stéréochimiques si une version sauvage de la protéine d'enveloppe n'est pas présente. Cela interfère avec l'arrangement de la protéine pVIII autour du noyau et empêche l'assemblage du phage.(181)

1.2.3.3. **Choix de la protéine d'enveloppe pour l'expression des peptides**

Les cinq protéines d'enveloppe du phage M13 ont déjà été utilisées comme partenaire de fusion afin de pouvoir exprimer les peptides à la surface du phage. Le choix de la protéine dépend de la taille de la protéine qui doit être exprimée et du nombre de copies à faire exprimer sur la surface du phage. Les deux protéines d'enveloppe habituellement utilisées dans les systèmes de *phage display* pour la protéine de fusion sont pIII et pVIII.(167) Les protéines d'enveloppe pVI (200-203), pVII (204) et pIX (205-210) sont beaucoup moins choisies pour la présentation des peptides, mais ont eu du succès dans plusieurs articles de *phage display*.(207, 211, 212)

La protéine d'enveloppe pIII

La protéine pIII, permet d'exprimer un maximum de 5 copies de la protéine de fusion par phage. En théorie, toutes les protéines pIII présentes sur le phage sont supposées exprimer la protéine de fusion à la surface. Cependant, une moyenne de 1 à 2 copies de pIII sont capables d'exprimer la protéine de fusion, ce qui fait que les systèmes de *phage display* utilisant pIII comme partenaire de fusion sont surtout utilisés dans la découverte de peptides ou de protéines qui se lient avec une grande affinité.(167) La protéine présentée dans la position N-terminale est séparée par un espaceur attaché au résidu N-terminale de pIII. Les peptides et les protéines relativement larges peuvent être accommodés dans la séquence de pIII dû à la faible restriction pour la longueur de l'insert.(166)

La protéine d'enveloppe pVIII

La protéine pVIII permet de d'exprimer la protéine de fusion en un nombre de copies beaucoup plus élevé. Le phage possède 2 700 copies de pVIII, ce qui lui permet d'être un bon candidat pour effectuer des tests d'avidités, d'interactions protéine-protéine et des essais immunologiques. Les protéines trouvées à l'aide de ce système sont sélectionnées pour leur grande avidité, mais une plus faible affinité avec la cible choisie.(167) Les peptides présentés sur pVIII sont de petite tailles d'un maximum de 10 résidus d'acides aminés ce qui n'est pas le cas pour pIII.(182) Les peptides d'une plus grande taille ne sont pas tolérés sur la partie N-terminale de pVIII et ne seront pas exprimés avec succès sur toutes les copies.(182, 213, 214)

Un insert de large taille affecterait le processus d'assemblage du phage. Une autre raison suggérée est que leur grande taille empêcherait le passage des nouvelles particules de phages à travers le canal de sortie pIV situé dans la membrane externe de la bactérie hôte.(215) En utilisant une protéine pVIII de type sauvage avec une protéine pVIII fusionnée, il est possible d'exprimer des protéines plus larges.(185, 216)

Les fusions de protéines qui peuvent affecter l'exportation des protéines d'enveloppe soit par leur taille et leurs caractéristiques particulières ne seront pas incluses dans la structure du phage mature. En effet, durant le processus de réplication du phage M13 l'assemblage complet du phage est effectué dans l'environnement périplasmique et toutes les protéines d'enveloppe sont insérées dans la membrane externe bactérienne avant l'assemblage du phage..(188) L'insertion de pIII dans la membrane dépend du système de sécrétion de l'*E. coli*. infecté. Cette propriété permet aux grosses protéines de fusion sur pIII d'être exportées plus facilement dans le périplasme comparé aux fusions de peptides de même taille sur pVIII.(217)

Le choix de la protéine utilisée pour la fusion dépend de l'objectif de la sélection. Il ne faut pas oublier que la taille et les caractéristiques de la protéine de fusion exprimée peuvent interférer avec la viabilité, la stabilité et la réplication du phage.(180)

1.2.3.4. **Types de bibliothèques exprimées**

Les cibles recherchées dans un projet vont déterminer les choix pour la construction de la bibliothèque de phages qui sera utilisée pour la sélection. Deux types de bibliothèques couramment utilisées dans les différents protocoles de *phage display* sont les bibliothèques de peptides et d'anticorps.

La bibliothèque de peptides

Une bibliothèque de peptides aléatoires est construite en utilisant des oligonucléotides dégénérés qui sont introduits dans le génome du phage. L'utilisation du codon $(NNK)_n$ est la méthode la plus courante pour créer une bibliothèque aléatoire de peptides. Le N représente un mélange équimolaire des 4 nucléotides (A : adénine, G : guanine, C : cytosine et T : thymine) et le K représente un mélange 1 : 1 de la guanine et de la thymine. En utilisant le format de codons $(NNK)_n$ au lieu de $(NNN)_n$, le nombre de codons *stop* possibles est réduit à un seul type

(TAG) au lieu des trois possibilités habituelles : TAA, TGA et TAG.(166, 218-220) Ce format de codon est utilisé dans la construction de librairies de peptides commerciales offertes par New England Biolabs.

Les peptides générés dans les librairies commerciales peuvent varier en longueur de 6 à 30 acides aminés. Les différents formats de peptide exprimés dans les librairies peuvent présenter des caractéristiques structurales qui peuvent favoriser des résultats intéressants pour une cible donnée. Les séquences peptidiques peuvent être sous une forme linéaire ou dans une forme contrainte. Les peptides structurellement contraints possèdent une cystéine à chacun des bouts de la séquence peptidique afin de créer un pont disulfide.(221) La structure contrainte en boucle offerte par les deux cystéines permettrait une meilleure affinité entre le peptide exprimé et la cible. Le faible degré de liberté conformationnel offert par la forme contrainte permet une liaison plus forte avec la cible.(181) Arap et al. (222) a démontré une forte accumulation des phages exprimant le motif NGR entouré de cystéine dans la tumeur du sein humaine greffée chez une souris. Aussi, une étude avec des souris a déterminé que la présence aux bouts de cystéines était nécessaire pour le ciblage de la microvascularisation présente au cerveau.(223)

Les peptides linéaires plus longs peuvent quant à eux prendre différentes conformations structurales pour favoriser leur liaison avec leur cible.(224) La longueur optimale des peptides d'une librairie aléatoire de *phage display* dépend de plusieurs facteurs qui répondent aux exigences du projet. Les propriétés des peptides exprimés pour adopter des conformations structurales variables, les caractéristiques de la cible utilisée pour la sélection et l'utilisation qui sera faite des peptides trouvés sont des facteurs qui peuvent influencer le choix de la librairie de peptides aléatoires.(221)

La construction de la librairie utilisée dans une expérience de sélection par *phage display* est très importante pour réussir à obtenir des candidats intéressants qui peuvent se lier à la cible. La réussite d'une librairie dépend de sa diversité et de la longueur des séquences exprimées par les phages. Des études ont démontrés qu'un peptide aussi petit que trois acides aminés pouvait être spécifique pour une molécule.(171) Chaque codon d'une librairie de peptide du format $(NNK)_n$ représente un mélange des 32 différentes combinaisons possibles de codons codant pour les 20 acides aminés et un codon *stop*. Donc, pour une librairie de

peptides de ce format, la diversité des séquences est donnée par la formule 20^n , dans laquelle le nombre 20 représente le nombre d'acides aminés possibles et le n indique le nombre de positions aléatoires dans la séquence. Par exemple, dans la librairie de *phage display* commerciale de New England Biolabs, le PhD-7mer, les peptides ont des séquences linéaires d'une longueur de 7 acides aminés. En théorie la diversité de cette librairie serait de 20^7 ($\approx 1.3 \times 10^9$) séquences possibles. En réalité, ce chiffre théorique de 1.3×10^9 représentant la diversité de la librairie de PhD-7mer n'est qu'une estimation de la variété maximale des séquences disponibles. La dégénérescence dans le codage des acides aminés fait en sorte qu'il peut y avoir des codons de terminaisons qui se produisent de façons aléatoires et peut donc réduire la variété de la librairie. L'efficacité de la transformation des phages pour exprimer les peptides est une autre explication de la baisse de diversité. Dans la construction des vecteurs pour la librairie de phage qui seront transformés dans des *E. coli* par électroporation ou d'autres techniques, l'efficacité de la transformation ne sera un succès que pour seulement 10^8 à 10^{10} d'entre eux. La concentration maximale de particules de phages filamenteux est $\approx 10^{14}$ particules/ml (≈ 170 nM) ce qui limite la diversité peptidique.(166, 181, 182, 225) La diversité des séquences possibles pour les librairies commerciales disponibles est malgré tout habituellement de l'ordre de $\approx 10^9$.(183)

La librairie d'anticorps

Les librairies aléatoires d'anticorps sont construites spécifiquement pour les expériences d'identification de fragments d'anticorps qui ont un effet biologique sur une cible. Les anticorps ont une forte affinité et spécificité pour leur cible. La partie Fab, le fragment de liaison de l'anticorps, et la partie scFv qui est le fragment variable à chaîne unique peuvent être exprimés à la surface des phages.(166) Les librairies d'anticorps sont un outil de découverte de nouvelles drogues biologiques pour des études à buts thérapeutiques.(226, 227) Les librairies d'anticorps peuvent être divisées en trois types : fragments d'anticorps immunitaires, naïfs et semi-synthétiques. Les librairies de fragments d'anticorps immunitaires peuvent provenir de lymphocytes B isolés d'un être humain infecté. La librairie d'anticorps naïve serait construite à partir des gènes des chaînes variables provenant d'un mélange de lymphocytes B périphériques de patients non infectés. La dernière catégorie de librairies, la semi-synthétique, est employée dans beaucoup d'études. La librairie semi-synthétique est

créée par l'assemblage des gènes V, D et J qui forment les parties de la chaîne lourde des anticorps en combinant les techniques recombinantes pour augmenter sa diversité.(228)

La partie scFv est la composante d'un anticorps qui est formée des régions variables de la chaîne lourde (V_H) et de la chaîne légère (V_L) qui sont reliées par un petit peptide flexible de liaison riche en glycine d'une taille variant de 10 à 25 acides aminés.(229) Ce peptide de liaison peut se lier à la partie N-terminale de la chaîne lourde avec la partie C-terminale de la chaîne légère ou inversement.(230) La présence de sérines ou de thréonines dans le peptide de liaison va permettre la solubilité du fragment scFv.(166)

La construction d'une librairie basée sur les anticorps dépend du type de fragment d'anticorps soit Fab ou soit scFv qui sera exprimé sur le phage. Chacun a des avantages et des inconvénients dont il faut tenir compte en fonction du but recherché pour l'expérience de *phage display*.(166)

Un des avantages des bibliothèques de fragment scFv est qu'elles sont plus faciles à construire par rapport aux bibliothèques de Fab. Des fragments multivalents de scFv peuvent être formés pour obtenir des fragments qui ciblent avec une forte avidité.(166) Les bibliothèques de Fab sont plus stables biologiquement comparées aux bibliothèques de scFv. Les sélections avec une librairie de Fab donnent des informations pour l'affinité avec la cible et non pour l'avidité étant donné que les fragments Fabs ne se multimérisent pas autant que les scFv. Le plus gros inconvénient d'une librairie de Fab est leur faible niveau d'expression dans l'*E. coli* par rapport aux scFv qui ont de plus petites tailles.(166, 231)

1.2.4. Principes de sélection par *phage display*

1.2.4.1. Criblage *in vitro*

Après avoir choisi ou construit une librairie de *phage display*, le but est d'effectuer un processus de criblage avec la librairie afin d'obtenir les clones de phages avec la plus grande affinité et sélectivité pour une cible. La technique de *phage display* permet d'enrichir à chaque tour de criblage par des conditions de lavage stringents les clones de phages avec la plus grande affinité avec la cible. Les protocoles de *phage display in vitro* sont semblables et comportent comme étapes : (1) la présentation de la cible à la librairie de phages pour la

sélection ou biopanning, (2) les lavages et l'éluion, (3) l'amplification des phages récupérés qui étaient liés à la cible. Ces trois étapes représentent un tour de sélection et sont habituellement répétées de trois à cinq fois dans un protocole de *phage display*. À la fin du criblage, c'est l'étape d'identification des peptides des clones obtenus par le séquençage de leur ADN. La capacité de liaison des séquences peptidiques obtenues avec la cible peut ensuite être validée par ELISA (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée), immunohistochimie ou immunofluorescence.(181)

1.2.4.2. Criblage *in vivo*

Le plus grand défaut de la technique de criblage *in vitro* par *phage display* est qu'elle ne peut pas représenter la complexité et l'hétérogénéité de l'environnement de la cible dans un organisme vivant. Cet inconvénient peut être résolu par un criblage *in vivo*. La technique a été décrite pour la première fois en 1996 dans une expérience de Pasqualini et Ruoslathi dans laquelle ils ont directement injecté une librairie de phage dans des souris vivantes pour récupérer les phages des différents organes séparément.(232) À la fin de leur criblage, ils ont réussi à obtenir des phages exprimant des peptides spécifiques au cerveau ou au foie. Depuis la publication de cet article, diverses études ont été effectuées sur différents modèles animaux atteints de différentes maladies.(233) La sélection *in vivo* par *phage display* permet d'identifier des ligands, des nouvelles molécules ou des récepteurs qui permettront le ciblage vers un tissu ou un organe spécifique pour différentes applications possibles. Cette approche ne nécessite pas une étape de pré-sélection étant donné que l'environnement de l'organisme va permettre la distribution des phages non-spécifiques dans tout l'animal tandis que les phages plus spécifiques vont se concentrer dans le tissu cible.

Ainsi un tour de sélection *in vivo* (appelé *biopanning*) comporte une étape d'injection de la librairie de phage dans l'organisme vivant, un temps déterminé de circulation des phages dans l'animal, une perfusion ou non, le prélèvement du tissu ou de l'organe cible ainsi que d'autres organes contrôles, la récupération des phages et leur amplification pour un autre tour de sélection. (Figure 5) La sélection comporte habituellement de trois à quatre tours de criblage.(234)

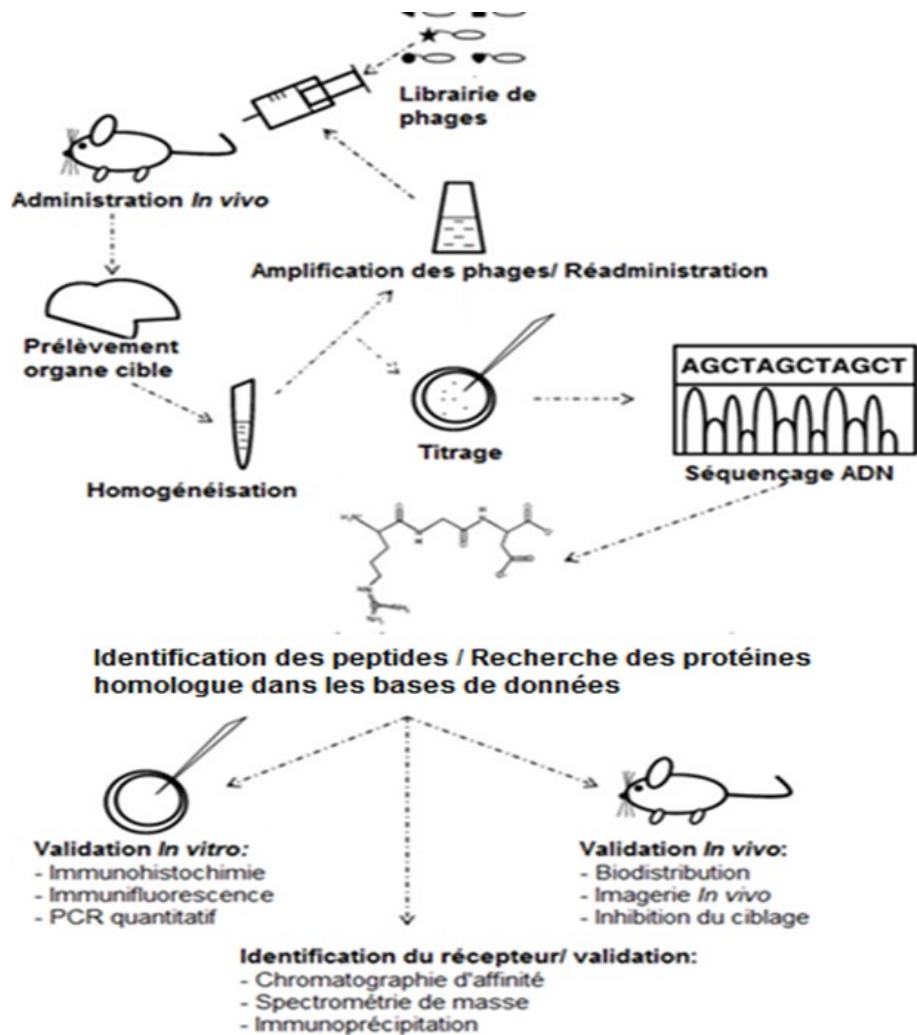


Figure 5. Schéma d'un tour de sélection in vivo par phage display chez la souris. Adapté de Bábíčková *et al.*, 2013.

Sélection et perfusion

Dans une sélection de *phage display in vivo*, la librairie de phages choisie est injectée par voie intraveineuse dans l'organisme choisi afin de pouvoir identifier les peptides qui vont interagir avec les molécules spécifiquement exprimées à la surface de l'endothélium du tissu ou de l'organe choisi. Les phages vont circuler pendant un temps prédéterminé. Un point important à retenir pour le criblage *in vivo* est la survie des phages dans un organisme vivant. Le système immunitaire et le système réticulo-endothélial peuvent affecter la survie des

phages. En effet, des analyses ont démontré une forte accumulation des phages spécifiques et non spécifiques dans le foie et la rate après l'injection.(235) Un article sur la biodistribution des phages injectés chez des souris avec différents systèmes immunitaires en fonction du temps indique que le plus grand taux de récupération d'une librairie de phages M13 de la circulation sanguine était fait cinq minutes après l'injection pour les souris CF-1 avec une bonne santé immunitaire et les souris SCID (sévère immunodéficience combinée) qui ne produisent pas des cellules T et des cellules B.(235) Pour une souris nue, déficiente en cellules T, mais qui produit normalement des cellules B et des lymphocytes NK, le temps optimal était de quinze minutes. Les résultats ont montré que quinze minutes après l'injection, il y a une diminution du taux de récupération des phages dans les trois souches de souris testées.(235) Ils ont observé des différences dans l'extravasation des phages pour différents organes. Les souris nues et SCID démontrent une plus faible accumulation dans la rate ce qui signifierait que l'extravasation est plus facile et qu'il y a une réduction de la capture non-spécifique du système réticulo-endothéliale.(235) Une étude effectuée par Srivastava et al.(236) avec des librairies de phages T7 injectées dans six souches de souris qui possèdent différents systèmes immunitaires a conclu que ce sont les cellules B qui sont les principales responsables de la dégradation des phages. Ils ont observé que cinq minutes après l'injection, pas plus de 50% des phages étaient récupérés dans le sang et qu'une infusion plus longue diminuait le taux de phages récupérés.(236) En moyenne, le temps d'infusion dans la littérature varie de cinq à quinze minutes dépendant du modèle animal.(222, 232, 237-239) Pour déterminer le temps optimal de circulation de la librairie de phages dans le modèle animal utilisé, le mieux est d'effectuer des tests préliminaires de biodistribution *in vivo*.(234)

Amplification

Après avoir laissé circuler les phages, il faut habituellement procéder à une perfusion afin d'éliminer les phages non-spécifiques et les phages spécifiques au sang. Dans la première mention de sélection *in vivo*, Rajotte et al.(237) ont perfusé une souris avec de la saline à partir du ventricule gauche. L'organe ou le tissu cible sera prélevé afin de récupérer les phages spécifiques par homogénéisation. Les phages récupérés sont amplifiés par une incubation dans un bouillon bactérien d'*E. coli* qu'ils peuvent infecter pour la répllication. Les phages amplifiés seront utilisés pour le prochain tour de sélection. Cette étape d'amplification permet d'obtenir

des milliers de représentants de chacun des clones de phages qui se sont liés à la cible. Au premier tour de la sélection, la librairie initiale de phages utilisée pour l'incubation avec la cible contient environ 100 copies de chaque clone de phages présents. Ce nombre dépend de la diversité de la librairie et la quantité de phage utilisée à cette étape. Par exemple, 2×10^{11} de la librairie Ph.D-7mer de New England Biolabs contient environ 100 copies pour chacune des séquences peptidiques exprimées.(240) Seulement, un petit nombre de ces clones sont récupérés à l'étape d'élution, ce qui fait qu'un clone peut être facilement perdu durant l'expérience.

L'étape d'amplification comporte des limites sur la diversité des peptides exprimés sur les phages. Certains peptides causent un biais au niveau de l'amplification qui fait en sorte que les phages qui les expriment ont de la facilité à se répliquer. Certains acides aminés ont quant à eux l'effet contraire. L'arginine est un acide aminé qui interfère avec la sécrétion de pIII ce qui fait qu'il y a une sélection négative pour les peptides contenant de l'arginine.(241) Les cystéines sont rarement exprimés dans les peptides parce qu'il semblerait que la formation de ponts disulfure non voulus interfère avec l'expression du peptide sur le phage. Un article décrivant les différences entre les systèmes des phages T7 et M13 de NEB indiquent que les résidus de glycines et valines sont sous représentés dans une librairie M13 alors que les prolines et les thréonines sont surreprésentées.(189) Certaines séquences peptidiques peuvent donc être présentes en plus grande quantité par rapport aux autres séquences ce qui peut causer des résultats faux-positifs.(180) L'étape de validation est donc nécessaire à la fin du processus de sélection.

L'étape d'amplification des phages est suivie par quelques cycles d'injections de phages, de perfusion vasculaire, de prélèvements d'organes et/ou de tissus, d'isolations de phages et d'amplifications pour réussir à obtenir à la fin des phages spécifiques à la cible choisie. À la fin de chacun des tours de sélection, une augmentation des phages spécifiques pour le tissu cible devrait être observée par rapport au tour précédent.(237)

Validation des peptides obtenus

Au dernier tour de *biopanning*, les phages spécifiques sont récupérés et leur ADN est extrait et séquencé pour identifier les peptides exprimés sur les phages. Les séquences peptidiques obtenues permettent généralement d'identifier un ou des motifs consensus

potentiellement spécifiques à l'organe cible. Ces séquences peptidiques doivent être validées quant à leur spécificité à la cible donnée. Les peptides correspondant peuvent alors être synthétisés avec l'ajout d'un fluorochrome ou d'un autre agent d'imagerie à la position N-terminale. Il faut cependant faire attention étant donné que, sur le phage, la position N-terminale est libre et participe à la liaison. Une façon de remédier à cela est d'ajouter un peptide de liaison. Le peptide de liaison commun le plus utilisé est le Gly-Gly-Ser qui est placé entre le peptide et la protéine d'enveloppe du phage. Ce peptide de liaison est ajouté en position C-terminale du peptide synthétisé.(242) Un acide aminé est habituellement ajouté après la sérine pour faciliter la conjugaison d'une molécule qui sera utile pour les prochaines expériences d'affinité et de spécificité à effectuer avec le peptide obtenu. Le peptide obtenu pourra être utilisé pour tester sa spécificité à la cible avec des cellules ou *in vivo*.(234)

Les séquences sont validées par des expériences *in vitro* ou des expériences *in vivo*. Les méthodes de validation *in vitro* habituellement utilisées sont des tests d'immunohistochimie (232, 237) et d'immunofluorescence (243, 244), de PCR quantitatif (réaction en chaîne par polymérase en temps réel) pour une quantification plus précise des colonies de phages spécifiques récupérées.(233) Les techniques de chromatographie par affinité ou d'immunoprécipitation de complexes protéiques combinées avec la spectrométrie de masse permettent d'identifier les cibles des peptides obtenus.(245) Les expériences *in vivo* effectuées pour confirmer la spécificité des séquences peptidiques obtenues sont des expériences concernant la biodistribution du peptide dans l'organisme, des tests d'imagerie permettant de visualiser les tissus ciblés par les peptides obtenus et des inhibitions du ciblage du peptide par des ligands compétitifs.(168) Les techniques d'immunomarquage peuvent utiliser des anticorps anti-phages pour visualiser la distribution intra-organe des clones de phages intéressants.(232, 237) D'autres études utilisent comme approches le marquage par fluorescence ou par radioactivité des clones de phages ou du peptide sélectionné synthétique.(243) Les résultats sont comparés avec ceux obtenus avec un phage contrôle sans insert, un phage avec un peptide n'exprimant pas de spécificité pour la cible ou un peptide qui exprime les mêmes acides aminés que le peptide d'intérêt, mais dans un agencement différent (« scramble »). Il est possible d'utiliser des banques de données de séquences peptidiques afin de rechercher des candidats partageant des similarités avec la séquence peptidique obtenue. La

recherche se fait par BLAST (*basic local alignment tool*) pour trouver des peptides qui auraient une région homologue avec le peptide d'intérêt par un alignement des séquences. Dans une sélection *in vivo* d'un modèle d'athérosclérose chez la souris, la recherche par BLAST avait ainsi permis d'identifier un motif d'homologie avec la chaîne alpha de VLA-4 (very late antigen-4), un ligand connu de VCAM-1 et donc d'identifier la cible du peptide comme étant VCAM-1, un marqueur endothélial des plaques athérosclérotiques.(246)

1.2.5. Applications du phage display

La technique de *phage display* utilisée à ses débuts comme un outil *in vitro* de criblage à haut débit est devenu, grâce à son application *in vivo*, une méthode de découverte de nouveaux peptides spécifiques aux biomarqueurs présents à la surface des organes dans des conditions pathologiques. Les applications du *phage display* se sont diversifiées pour répondre à différents besoins de criblage.

1.2.5.1. Hétérogénéité de l'endothélium

Pasqualini et de Ruoslathi (232) ont été les premiers à décrire l'utilisation du *phage display* dans une sélection *in vivo* qui a permis d'identifier des peptides ciblant l'endothélium du cerveau et d'autres ciblant le foie chez la souris BALB/c. L'étude sur le ciblage d'organe *in vivo* par *phage display* démontre qu'une population homogène de phages qui expriment des peptides partageant le même motif consensus pouvait cibler l'organe duquel ils avaient été récupérés. Le résultat obtenu était la première démonstration que les peptides obtenus par une sélection de *phage display in vivo* pouvaient être utilisés pour cibler spécifiquement une cible donnée après une injection systémique. Cet article est devenu la base des études sur la sélection *in vivo*.(247)

Une de ces études de *phage display in vivo* a permis de révolutionner l'application de la technologie de *phage display in vivo* pour l'identification de nouveaux ligands cibles pour des sites spécifiques. L'étude effectuée par Rajotte *et al.*(237) aborde la notion de l'hétérogénéité de l'endothélium vasculaire. En étudiant par *phage display* l'endothélium de divers tissus, il découvre l'existence de biomarqueurs endothéliaux dont il fait le rapprochement avec un système d'adresse moléculaire spécifique pour différents organes chez

la souris. Les molécules présentes à la surface de l'endothélium des différents organes expriment un certain nombre de protéines uniques pouvant être identifiés, ou à tout le moins ciblés, par les peptides exprimés sur les phages. En récupérant les phages de différents tissus par *phage display*, des phages qui ciblaient spécifiquement un organe cible ont été obtenus après quelques tours de criblage. Des motifs consensus ont été identifiés pour chacun des organes testés. Leur capacité à cibler le poumon, la peau ou le pancréas a été validée par immunohistochimie. Les phages se retrouvaient dans les vaisseaux sanguins de leur organe cible respectif. Une expérience compétitive de ciblage avec le peptide synthétisé a montré une inhibition du ciblage du phage. Chaque organe peut exprimer plusieurs marqueurs moléculaires différents, mais il existerait un nombre limité de ces marqueurs. La sélection *in vivo* permet d'éliminer plus facilement les phages non spécifiques se liant aux sites non-ciblé lors de la circulation dans l'organisme. Des études de sélection sur les tissus cancéreux indiquent que les lésions endothéliales peuvent permettre aux phages de quitter le lit vasculaire et de s'accumuler dans l'espace interstitiel. Les peptides exprimés à la surface des phages ont donc la propriété de pouvoir pénétrer les tissus dont l'endothélium est endommagé.(233, 248, 249)

La notion d'hétérogénéité moléculaire a permis d'utiliser la technique de *phage display in vivo* dans des modèles animaux précliniques afin d'identifier de nouvelles cibles à des buts de thérapies et d'imagerie. Plusieurs organes et modèles animaux utilisés dans les criblages *in vivo* ont eu du succès pour la découverte de nouveaux marqueurs moléculaires et sont rapportés dans des revues sur le sujet.(168, 233)

1.2.5.2. Études *in vivo* chez l'humain

La première mention d'études *in vivo* chez l'être humain a été faite en 2001 par Arap et Pasqualini qui ont réalisé l'expérience chez un patient dans un coma.(170, 171) Ils ont injecté par voie intraveineuse une librairie de phages chez un patient diagnostiqué avec la maladie de Waldenström.(171) Après une courte infusion de la librairie de phages CX₇C (C; cystéine; X : n'importe quel acide aminé), ils ont procédé à de multiples biopsies de tissus de plusieurs organes (la moelle osseuse, le gras, du muscle squelettique, la prostate et la peau). Les milliers de clones des phages obtenus ont été analysés rapidement par des techniques

bioinformatiques. Une analyse à haut-débit sur l'homologie des motifs découverts a révélé différentes protéines exprimées à la surface cellulaire dont la spécificité pour les différents organes doit être validée.(171) Cette découverte à grande échelle d'environ 50 000 peptides ciblant différents organes a démontré que la distribution peptidique dans le tissu humain n'est pas aléatoire.(171) Pour chacun des organes, ils ont identifié de courts motifs d'une taille de 3 acides aminés qui étaient fréquemment représentés. Sur les 25 motifs tripeptidiques associés à un organe, 11 d'entre eux sont enrichis pour un seul organe et le restant est non-spécifique. Ces résultats ont confirmé l'hypothèse que certains peptides peuvent se lier à un marqueur endothélial spécifique d'un tissu alors que d'autres peptides se lient à des marqueurs ubiquitaires présents sur la surface des cellules vasculaires.(171)

Dans un article publié en 2004 de Zurita *et al.*(244), la séquence cyclique CGRRAGGSC, a été identifiée comme étant un ligand pour le récepteur de l'interleukine-11 alpha. Cette séquence provenant de la première étude *in vivo* chez l'homme cible la prostate.(171) La validation a été faite par immunohistochimie et un test de ciblage *in vitro* dans des cellules de cancer de prostate. Un autre chercheur, Wu, a caractérisé la spécificité de la séquence CGRRAGGSC par ciblage *in vivo* chez une souris avec une xénogreffe de cellules cancéreuses de prostate humaine PC-3.(250) La forte accumulation *in vivo* dans la tumeur du peptide marqué radioactivement a démontré son potentiel comme un agent d'imagerie pour détecter la surexpression de l'IL-11 dans les tumeurs et les métastases osseuses tel que le cancer de la prostate.(250)

Staquicini a repris les résultats obtenus du premier tour de sélection *in vivo* par *phage display* de l'expérience d'Arap et Pasqualini pour effectuer deux autres tours de criblages chez deux autres patients.(251) Les deux patients étaient atteints d'un stade avancé d'un cancer de la prostate. Les deux patients ont reçu une infusion de courte durée de la librairie de phages provenant du premier et du deuxième patient, selon le tour de sélection. À chacune des étapes de sélection, des biopsies de tissus de la prostate, du foie, d'échantillons de métastases, de la peau, du tissu adipeux et du muscle squelettiques ont été prélevés pour récupérer les phages liés. Parmi les 15 séquences peptidiques trouvées, quatre d'entre elles ont été validées par immunohistochimie et des essais de liaisons.(251)

Une expérience *in vivo* a été faite chez six patients atteints soit du cancer du sein ou d'un mélanome chez lesquels ont été injectés une librairie de phages exprimant des peptides dans une étude clinique de phase I afin d'isoler des clones spécifiques.(252) Les clones séquencés ont été analysés et validés pour leur spécificité à leur cancer respectif par des expériences d'immunomarquage et de PCR quantitative. Parmi les six patients, un patient avait reçu trois infusions de phages correspondant à trois tours de sélections, deux patients ont eu deux infusions et les trois autres ont reçu une infusion. L'étude de Krag a montré que les peptides trouvés chez les patients avec un cancer du sein avaient une homologie de séquence avec la protéine précurseur CREG1, le récepteur de la prostaglandine E2, le *neurogenic locus notch homologue protein 2 precursor*, le *breast carcinoma amplified sequence 3*, le *zinc finger homeobox protein 2* et l'intégrine $\alpha 6$.(252) L'article mentionne aussi qu'il n'y a pas eu de toxicité ou d'effets secondaires importants chez les patients après l'infusion de la librairie de phage.

La même étude parle des clones isolés chez un autre patient qui avait des mélanomes malins. Les clones qui démontraient une forte affinité pour les mélanomes ont été choisis pour des analyses d'ELISA par chimioluminescence afin de tester leur capacité à cibler les cellules cancéreuses du patient.(252) Le peptide MRIRCAAWRATGTHCSLRA a démontré par immunofluorescence sur des cellules de mélanomes isolées provenant du même patient une capacité à se lier 3 fois plus grande par rapport à la librairie non-sélectionnée. Ce peptide isolé ne s'est pas lié aux cellules sanguines du même patient ou aux cellules cancéreuses appartenant aux patients avec un cancer du sein. L'analyse de la séquence peptidique avec la banque de données de protéines Swiss-Prot a révélé que le peptide partageait un motif homologue avec le *human multiple epidermal growth factor-like domain protein 7*.(252)

1.2.5.1. La sélection *in vivo* en série synchrone

Les protocoles habituels de criblage *in vivo* effectuent trois à quatre tours de sélection avec une librairie de phage afin de pouvoir enrichir les phages spécifiques à un organe cible. Pour chaque tour de criblage, un animal différent est utilisé.(253) La nécessité d'effectuer de multiples tours de sélection des phages pour chacun des organes à étudier dans l'organisme vivant entraîne une grande perte de temps et de ressources pour l'expérimentateur. Dans

l'article de *phage display* détaillant un tour de sélection *in vivo* chez l'humain, l'analyse de plusieurs milliers de clones de phages a été effectuée afin pouvoir identifier les peptides spécifiques de façon significative statistiquement.(171, 253) Pour les expériences qui cartographient la vascularisation systémique, l'analyse quotidienne d'un aussi grand nombre de clones de phages à traiter n'est pas pratique. Kolonin *et al.*(238) ont décrit une méthode d'optimisation synchronisée par *phage display* afin d'identifier les peptides spécifiques aux organes provenant de multiples tissus dans un criblage simultané. (Figure 6)

En ciblant les différents organes dans un tour de sélection dans le même animal, il est possible d'analyser moins de peptide que lors du criblage chez l'humain (171) grâce à la puissance statistique générée par les tours de sélections subséquents.(238) Ce criblage effectué chez les souris a été fait de manière à isoler des peptides qui ciblent spécifiquement un des six différents organes murins (les muscles, les intestins, l'utérus, les reins, le pancréas et le cerveau). À chaque tour de sélection, les clones de phages étaient isolés des différents tissus cibles et amplifiés. Ensuite, les clones de phages amplifiés obtenus étaient combinés ensemble pour être injectés dans une souris au tour suivant.(238) Les séquences peptidiques découvertes étaient ensuite analysées par une plate-forme statistique spécifiquement développée pour identifier les motifs enrichis dans les tissus cibles. Pour démontrer l'efficacité de la stratégie, un des peptides (CRVASVLPC) a été validé comme étant un peptide imitateur d'un ligand naturel du récepteur de la prolactine (PRLR) dans le pancréas dans des tests d'immunomarquages sur des cellules et du tissu.

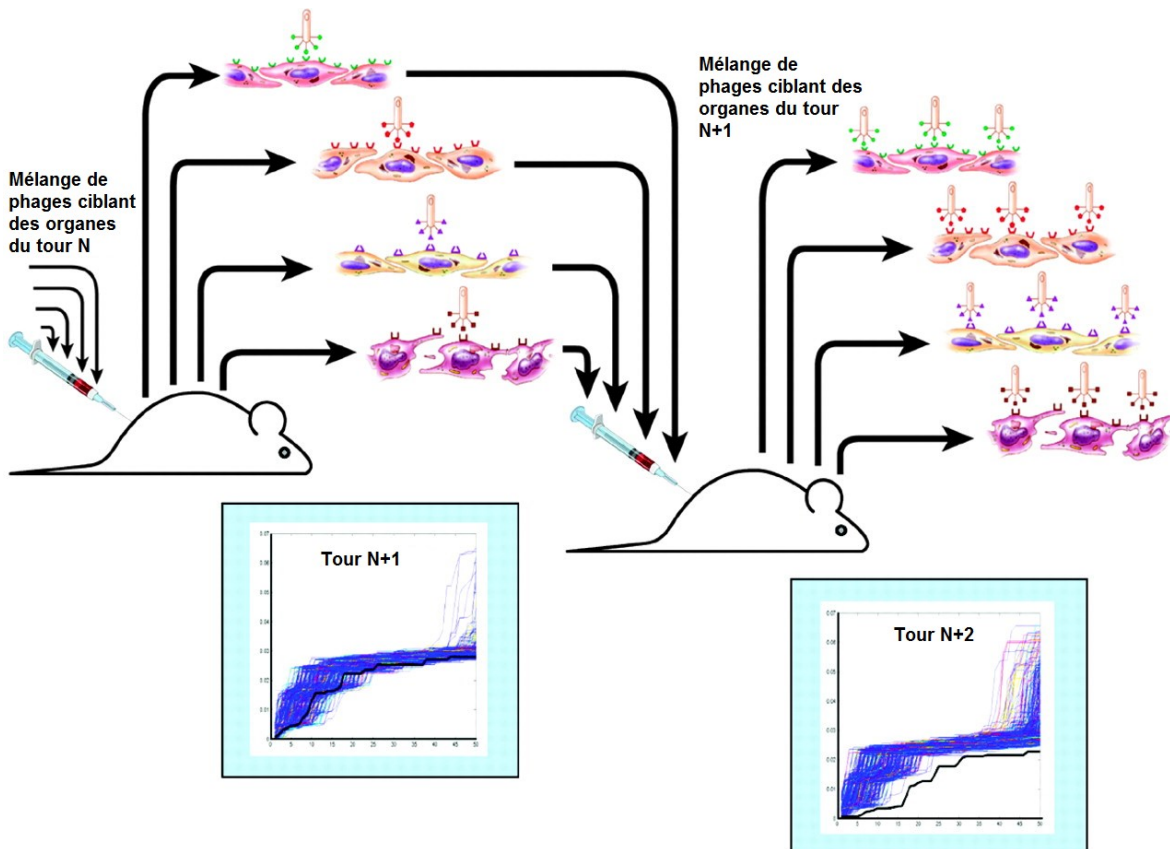


Figure 6. Schéma d'une sélection *in vivo* en série synchrone chez la souris. Adapté de Kolonin, M.G. et al., 2006.

1.2.6. Application du *phage display* pour le ciblage thérapeutique

Les bibliothèques de peptides de *phage display* utilisées dans des criblages à haut débit jouent un rôle important dans le développement clinique de nouveaux médicaments.(166) Les peptides obtenus par un criblage *in vitro* ou *in vivo* doivent être modifiés avant leur utilisation dans des essais cliniques. Les peptides obtenus ont habituellement de pauvres propriétés pharmacocinétiques. Leur temps de demi-vie est court surtout pour ceux qui sont administrés oralement, ils ont une dégradation enzymatique rapide, une faible capacité de pénétration à travers la membrane intestinale et une excrétion rapide. Ces facteurs contribuent à une faible biodisponibilité.(254, 255) Toutefois, ce court temps de demi-vie peut être utile pour

l'imagerie afin d'enlever les bruits de fonds produits par la grande quantité de la sonde. Malgré ces inconvénients, les peptides sont des molécules biologiquement actives importantes impliquées dans les interactions peptides-protéines non covalentes qui permettent de contrôler une multitude de réactions biologiques et de voies de signalisations. Les thérapies basées sur les peptides sont un sujet de recherche important pour la découverte et le développement de nouvelles drogues.(166)

L'utilisation en clinique de peptides à des buts thérapeutiques ou diagnostiques est largement étudiée dans plusieurs domaines médicaux.(256) Le marché des drogues thérapeutique basées sur les peptides est lucratif et en pleine expansion.(166) Les peptides ont plusieurs avantages comparativement aux protéines intactes et même aux anticorps. Leur faible coût de synthèse est idéal pour une production à grande échelle, alors que la production d'anticorps est beaucoup plus laborieuse et de longue durée.(257) Aussi, la synthèse de peptides est plus propre étant donné qu'elle ne nécessite pas l'élimination de contaminants provenant des bactéries et de la culture cellulaire,(258) une meilleure activité biologique et une plus grande stabilité. Les courts peptides, définis par une taille plus petite que 10 acides aminés, sont non- ou peu immunogéniques, ce qui en fait des candidats plus sécuritaires pour des utilisations cliniques qui permettent de multiples administrations au même patient.(258) Finalement, les peptides sont plus efficaces pour la pénétration des organes grâce à leur petite taille.(259)

La technologie de *phage display* a découvert plusieurs nouveaux peptides qui sont développés pour être approuvés en clinique ou en essais cliniques. Une revue de différents médicaments développés à partir du *phage display* a été effectuée par Hamzeh-Mivehroud *et al.*(166) Plusieurs de ces médicaments à base de peptides ont été approuvés pour une utilisation en clinique ou en essai de clinique.

1.2.7. Applications du *phage display* pour l'imagerie

La découverte de nouveaux peptides pour leur capacité de ciblage permet de faire de l'imagerie ou de surveiller des organes cibles. Les nouvelles sondes basées sur les peptides sont en plein évolution grâce au développement de la chimie combinatoire par *phage display*. Ces sondes permettraient la visualisation en temps réel de la biomolécule dans une pathologie

pour faciliter le diagnostic. La possibilité de faire l'imagerie *in vivo* en temps réel de façon non invasive de diverses maladies retient l'attention de plusieurs chercheurs. Les peptides obtenus par *phage display* peuvent être utilisés comme sondes par la conjugaison avec un marqueur radioactif (^{99m}Tc , ^{111}In , ^{18}F -FDG, ^{64}Cu et ^{68}Ga). (164) Des recherches sont effectuées aussi pour le développement de systèmes d'imagerie par bioluminescence et par fluorescence. Des sondes d'imageries bi-modales pourraient aussi être développées afin de profiter de tous les avantages de chaque technique d'imagerie. (164)

L'imagerie moléculaire pour le diagnostic du cancer est un des domaines d'application du *phage display* qui est le plus étudié. (164) Une librairie de peptide basée sur la séquence peptidique KCCYSL a permis de trouver un candidat, le 1-D03 (MEGPSKCCYSLALSH), qui cible ErbB2 (*receptor tyrosine-protein kinase erbB-2*) avec une meilleure spécificité et pharmacocinétique pour le cancer du sein que la séquence KCCYSL. (260) Ce candidat a été obtenu par la maturation d'affinité en modifiant la séquence peptidique de base par des ajouts ou des remplacements d'acides aminés afin d'améliorer son affinité et sa spécificité pour une cible donnée. La spécificité du peptide 1-D03 radiomarqué avec ^{111}In -DOTA a été visualisée par SPECT dans une souris avec des cellules de cancer du sein humain. D'autres peptides découverts par une sélection *in vivo* de *phage display* incluent un peptide se liant à l'endothélium du cancer de l'estomac (261), à VCAM-1 (239), des peptides contenant le motif RGD qui se lient à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (222, 262-267), etc. D'autres ont plutôt ciblé des protéines surexprimées dans les tumeurs. Ils ont ainsi réussi à obtenir des peptides qui ciblent ErbB2 (268-270), la mélanine (271), l'hépsine dans le cancer de la prostate (272) et la plectine-1 présente dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique (273).

Il est possible d'utiliser le phage exprimant le peptide candidat en le marquant avec un fluorochrome émettant dans le proche infrarouge pour effectuer des études d'imagerie nécessitant un signal pendant une longue période de temps. (274-277) D'autres laboratoires ont développé les phages comme vecteur d'imagerie radionucléaire pour le SPECT et le PET. (164) L'emploi des phages comporte plusieurs avantages parce qu'ils sont facilement renouvelables, économiques et le peptide est déjà présenté sous sa forme bioactive originale obtenue lors du criblage. Ce dernier facteur est important parce que le peptide obtenu n'a pas perdu sa capacité de ciblage et ses propriétés physiologiques, ce qui peut survenir lors d'une

synthèse chimique. La possibilité de marquer les phages avec plusieurs marqueurs et d'avoir en même temps plusieurs copies du peptide spécifique permet d'amplifier le signal obtenu. Avec les études de sélection chez les humains pour des cancers du sein, du pancréas, de la prostate et du mélanome, l'utilisation de phages comme intermédiaire d'imagerie moléculaire dans des essais cliniques serait intéressant.

1.3. Hypothèse et buts

La sténose valvulaire aortique est une maladie cardiaque dont le processus actif est caractérisé par des dépôts de lipides, de l'inflammation, de la fibrose et une calcification active des feuillets qui progresse vers un épaississement et durcissement de la valve aortique et une diminution de l'aire d'ouverture de la valve aortique. Nous avons émis l'hypothèse que la pathogénèse modifie progressivement l'endothélium valvulaire et/ou provoque une désendothélialisation de la valve aortique ce qui engendre l'expression de biomarqueurs uniques spécifiques aux tissus et à la maladie. Le but de ce projet est de découvrir des peptides qui cibleraient la surface de la valve aortique, particulièrement dans le cadre de la sténose valvulaire aortique.

L'objectif serait réalisé par l'utilisation de la technique de sélection *in vivo* de bibliothèques de peptides aléatoires de *phage display* dans un modèle de la SVA chez la souris athérosclérotique. Des clones de phages seront sélectionnés aléatoirement pour faire séquencer leur ADN afin de déterminer l'identité de chacune des séquences peptidiques exprimées à la surface des phages. La spécificité de la liaison serait validée par des tests d'immunohistochimie *ex vivo* sur des valves malades et des organes contrôles en utilisant des marquages de coupes de tissus de valves aortiques provenant de souris athérosclérotiques avec les clones de phages obtenus.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

Les kits de bibliothèques de peptides aléatoires de *phage display* Ph.D.-7mer et Ph.D.-C7Cmer ont été achetés chez New England Biolabs (Ipswich, MA, USA, # cat E8100S et E8120S). Les bibliothèques contiennent environ $2,8 \times 10^9$ séquences de peptides aléatoires possibles de 7 acides aminés qui ont été amplifiées à un titrage de 2×10^{13} pfu (*plaque forming unit*)/ml. La lignée souche d'*E. coli* ER2738 F' *proA+B+ lacI^f Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (Tet^R)/fhuA2 glnV thi Δ(lac-proAB) Δ(hdsMS-mcrB)5* (rk⁻ mk⁻ McrBC⁻) présente dans le kit de *phage display* a été utilisée pour la propagation des phages M13. Pour le séquençage de l'ADN des phages, l'amorce -96 gIII: 5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' a été utilisée. Le Tween-20 (polyoxyéthylène sorbitan monolaurate, Bio-Rad, # cat 170-6531) est utilisé comme détergent dans les solutions de lavages pour l'immunohistochimie.

2.1.1. Préparation du matériel pour le *phage display*

2.1.1.1. Milieu Luria Broth (LB)

10 g de bacto-tryptone (Sigma-Aldrich, # cat T7293), 5 g d'extrait de levure (Sigma-Aldrich, # cat Y1625) et 5 g de chlorure de sodium (NaCl, Fisher Scientific, # cat BP3581) sont dissout dans 1 L d'eau déminéralisée et stérilisés à l'autoclave.

2.1.1.2. Pétri d'agar de X-gal/IPTG

Les phages utilisés dans le projet proviennent d'une bibliothèque créée avec le vecteur de clonage M13mp19 qui contient le gène *lacZα*. Le 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal, Invitrogen, # cat B-1690) est un substrat pour la β-galactosidase qui est la protéine exprimée par le gène *lacZα*. Les phages de la bibliothèque utilisée sont identifiés par des plaques bleues sur les pétris d'agar X-gal/IPTG. L'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG, Invitrogen, # cat AM9464) se lie et inhibe le répresseur de l'opéron lactose permettant ainsi l'induction de la transcription du gène de β-galactosidase dans le système du phage. La β-galactosidase va cliver l'X-gal qui va former par oxydation une plaque bleue.

Une solution a été préparée en dissolvant 1 g d'X-Gal et 1.25 g d'IPTG dans 25 ml de diméthyle formamide (DMF, Sigma-Aldrich # cat D4551). La solution est conservée dans le noir à -20 °C. L'agar a été préparé en dissolvant 16 g d'agar dans 1 L de milieu LB et ensuite autoclavé. Une fois l'agar refroidi (< 70 °C), 1 ml de la solution d'X-Gal/IPTG est ajouté et l'agar est versé dans les pétris. L'agar a été gélifié à température de la pièce avant d'être conservé dans le noir à 4 °C.

2.1.1.3. **Top agar**

10 g de bacto-tryptone, 5 g d'extrait de levure, 7 g d'agar et 5 g de NaCl sont dissous dans 1 L d'eau et la solution est stérilisée par autoclavage.

2.1.1.4. **TBS**

Une solution de 50 mM de Tris (Invitrogen, # cat 15504-020) est ajustée à un pH de 7,5 et ensuite 150 mM de NaCl est dissous dans 1 L d'eau et la solution est stérilisée à l'autoclave.

2.1.1.5. **PEG/NaCl**

2,5 M de NaCl et 20 % (p/v) de polyéthylène glycol-8000 (Omnipur, # cat 6510) sont dissous dans 1 L d'eau et la solution est autoclavée.

2.1.1.6. **Stock de tétracycline en suspension**

Une concentration de 5 mg/ml de tétracycline (Sigma-Aldrich, # cat 87128) a été mélangée dans une solution 1 :1 d'éthanol et d'eau stérile. La solution stock de tétracycline est conservée à -20 °C dans le noir.

2.1.1.7. **Tampon d'iodure**

Une solution de concentration finale de 10 mM de Tris-HCl ajusté à un pH de 8,0, de 1 mM d'EDTA et de 4 M d'iodure de sodium (NaI, Sigma-Aldrich, # cat 409286) est préparée dans 100 mL d'eau autoclavée. La solution est gardée à température pièce, dans le noir. Elle est jetée dès que la solution n'est plus claire et qu'il y a coloration causée par l'oxydation de l'iodure de sodium.

2.2. Modèles animaux de la sténose valvulaire aortique

2.2.1. Approbation du comité d'éthique

Les protocoles d'expérimentation et de soins des animaux ont respecté les lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux (CCAC) et ont été approuvés par le comité d'éthique des animaux de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

2.2.2. Animaux

Un total de 25 souris mâles athérosclérotiques (ATX) âgées entre 16 à 22 mois a été utilisé pour les expériences. Les souris ATX obtenues du Dr Eric Thorin (C57Bl/6-*Ldlr*^{-/-};Tg(hApoB-100)) ont été nourries avec une diète normale standard (Tecklad 2014S, Harlan Laboratories, Montréal, Qc, Canada) étant donné que les souris ATX développent spontanément des lésions athérosclérotiques avec l'âge.(278) Les souris ATX n'expriment pas le récepteur LDL et surexpriment le gène humain de l'apolipoprotéine B-100. Le développement de la SVA chez les souris se fait avec l'âge.

2.2.3. Échocardiographie

Les mesures échocardiographiques ont été prises selon la méthode mentionnée dans l'article de Trapeaux *et al.*(98) Durant la prise des données échocardiographiques, les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane (2,5 % dans 500 ml de O₂ min⁻¹, Laboratoire Abbot, Montréal, Qc, Canada). Les études échocardiographiques transthoraciques ont été réalisées au niveau basal de 14,7 mois et à 19,6 mois jusqu'à un développement significatif de la SVA caractérisé par une réduction significative de l'aire de la valve aortique. Les données échocardiographiques ont été prises avec la sonde i3L (10-14 Mégahertz) en utilisant un système standard échographique (Vivid 7 Dimension, GE Healthcare Ultrasound Horten, Vestfold, Norvège).

Les coupes d'imagerie parasternales longitudinales et courtes de la valve aortique ont été prises afin de déterminer la morphologie des feuillets. Le diamètre du LVOT a été mesuré dans une coupe parasternale longitudinale agrandie et l'aire transversale du LVOT (CSA_{LVOT})

a été calculé selon l'équation : $CSA_{LVOT} = \pi (LVOT \text{ diameter}/2)^2$. La vitesse du LVOT (V_1) et le temps de vitesse intégrale (VTI_{LVOT}) ont été obtenus avec une sonde Doppler d'ondes pulsées placée à proximité de la valve aortique dans une coupe apicale des cinq chambres. Des ondes Doppler continues traversant la valve aortique ont été utilisées pour obtenir la vitesse maximale transvalvulaire (V_2) et la VTI (VTI_{AO}) dans la même coupe. L'aire de la valve aortique a été obtenue à chacun des points de mesures par l'équation de continuité qui est égal à $CSA_{LVOT}(VTI_{LVOT}/VTI_{AO})$. L'épaisseur au milieu de la valve aortique a été mesurée à la fin de la diastole dans une coupe parasternale longitudinale agrandie au niveau de base et à la mesure finale échographique.

La moyenne des mesures de trois cycles cardiaques consécutifs a été utilisée pour chaque variable. Une attention particulière a été prise pour obtenir des images planes similaires sur des examens en série en révisant les données prises avant l'étude de suivi. Toutes les images et les mesures échographiques ont été réalisées en suivant le protocole par le même investigateur expérimenté.

2.3. Sélection *in vivo* par phage display

2.3.1. Protocole de sélection *in vivo* chez la souris ATX

Avant de débiter l'expérience, la souris est anesthésiée par inhalation d'isoflurane. La souris est maintenue sous anesthésie durant toute la procédure. De l'héparine (100 U/kg) est injectée par voie intra-péritonéale. Deux expériences indépendantes de sélection par *phage display* ont été effectuées parallèlement en utilisant deux bibliothèques de peptides aléatoires différentes. Une sélection a été effectuée avec la bibliothèque Ph.D.-7 (New England Biolabs, Ipswich, MA, # cat E8100S) exprimant des séquences aléatoires de 7 acides aminés et la deuxième sélection a été faite avec la bibliothèque Ph.D.-C7C (New England Biolabs, Ipswich, MA, # cat E8120S) qui exprime une bibliothèque de 7 acides aminés de séquences aléatoires exposés dans une boucle délimitée par 2 cystéines. Une quantité de 2×10^{11} phages d'une bibliothèque contenue dans un volume de 150 μ L de PBS stérile est injectée dans la veine caudale avec une aiguille 30G (BD ref: 305106). Quatre minutes après l'injection, après avoir vérifié l'endormissement de la souris par le pincement de la patte, une incision de la peau du dessus

du sternum est effectuée pour ouvrir la cavité abdominale jusqu'à l'aîne pour exposer la pointe de branche de la veine cave. Le diaphragme et le péricarde sont coupés pour exposer le cœur battant. 5 minutes après l'injection des phages, un échantillon de sang (200 µL) est recueilli par ponction cardiaque du ventricule gauche avant que l'animal ne soit perfusé et sacrifié par perfusion sous pression physiologique (débit : 2 ml/min) avec de la solution de Ringer lactate en utilisant un papillon 25G. La veine cave inférieure est coupée sous le foie du côté gauche. La perfusion se poursuit jusqu'à ce que le perfusât de la veine cave soit transparent et que les organes soient débarrassés de leur sang. (~10 ml). Les organes cibles (la racine aortique et les ventricules) sont prélevés de la souris de même que d'autres organes contrôles tels que le cerveau, le foie et les poumons. Les tubes contenant les tissus sont congelés dans l'azote liquide.

2.3.2. Extraction des tissus

L'organe d'intérêt est dégelé lentement sur glace. Il est ensuite pesé et placé dans un tube de 5 ml. 1 ml de DMEM/1 % albumine de sérum bovin (BSA, BSA fraction V, Fisher Scientific, # cat BP1605-100)/ 1 % Cocktail d'inhibiteur de protéases (Sigma, # cat P2714) froid est ajouté dans le tube avant d'homogénéiser. L'organe est homogénéisé par un ribolyseur (Power Gen 125, Sawtooth 7 x95, Fischer Scientific) à vitesse maximale pendant 30 secondes. Le tube est laissé ensuite sur glace pendant cinq minutes. Il faut répéter l'étape d'homogénéisation de deux à trois fois jusqu'à homogénéisation complète du tissu. L'extrait de tissu est transféré dans un Eppendorf et laissé sur glace pendant cinq minutes. Le tube contenant l'extraction d'homogénat de l'organe cible est ensuite centrifugé à 16 060 g pendant dix minutes à 4 °C. Le surnageant est recueilli dans un nouvel Eppendorf et laissé sur glace. Un volume de 500 µL DMEM/1 % BSA/ Cocktail PI est rajouté dans le tube contenant le culot pour le laver. Le tube contenant le culot est ensuite centrifugé à 16 060 pendant dix minutes à 4 °C. Le surnageant est recueilli dans le tube contenant la première partie de l'extraction de l'organe cible. L'homogénat est conservé à 4 °C pendant un temps maximum de deux semaines ou jusqu'à l'amplification et au titrage pour le prochain tour de sélection.

2.4. Amplification, titrage et séquençage des clones de phages

2.4.1. Amplification

La journée avant l'étape d'amplification des phages spécifiques, il faut lancer une culture bactérienne d'*E. coli* ER2738 qui servira à amplifier les phages spécifiques. Le lendemain, il faut partir une autre culture bactérienne d'*E. coli* ER2738. Pour cette culture, une colonie d'*E. coli* est piquée et inoculée dans 10 ml de LB supplémenté de tétracycline (20 µg/ml). La culture est arrêtée à une densité optique (D.O.) de 0,5 et elle sera utilisée pour le titrage. 2 µl de l'homogénat est récupéré pour effectuer le titrage de l'extraction de tissu non amplifié. Le restant de l'homogénat est ajouté dans une fiole Erlenmeyer de 250 ml pour infecter la culture bactérienne d'ER2738 dilué (1/100) de 20 ml. Cette solution est incubée pendant 4h30 à 37°C avec une agitation vigoureuse. Suite à l'incubation, la culture bactérienne contenant les phages est transférée dans un tube Falcon de 50 ml et centrifugée pendant 60 minutes à 3000 g. Le surnageant est récupéré dans un autre tube et centrifugé une autre fois pendant 60 minutes à 3000 g. 80 % du haut du surnageant est récupéré dans un autre tube et une solution de 20 % PEG/2,5M NaCl correspondant à 1/6 du volume total est ajoutée. Les phages vont précipiter durant la nuit à 4 °C. Le précipité de phages liés au PEG est centrifugé pendant 60 minutes à 3000 g, 4 °C. Il faut ensuite décanter et jeter le surnageant. Le tube est centrifugé brièvement et le résidu de surnageant est enlevé avec une pipette. Le culot blanc représente les phages. Ce culot est suspendu dans 1 ml de TBS et ensuite transféré dans un tube Eppendorf pour être centrifugé à 16 060 g pour 5 minutes à 4 °C. Le surnageant est transféré dans un autre tube Eppendorf dans lequel une solution de 20 % PEG/2,5M NaCl, correspondant à 1/6 du volume total du surnageant est ajoutée. La solution de phages liés au PEG est incubée sur glace pendant 60 minutes et centrifugée à 16 060 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant est jeté et le culot est centrifugé brièvement pour ensuite enlever le résidu de surnageant. Le culot obtenu est resuspendu dans 200 µl de TBS. Cette solution est centrifugée pendant 1 minute à 16 060 g à 4 °C. Le surnageant est récupéré dans un autre tube et il représente les phages amplifiés purifiés. Le processus de sélection est répété trois autres fois en prenant les phages sélectionnés et amplifiés de la ronde précédente pour injecter dans

une autre souris à la même concentration que le premier tour de sélection. Quatre tours de sélection ont été faits pour les sélections *in vivo* chez la souris. Pour le quatrième tour de sélection des deux bibliothèques, une quantité 10X moindre de phages, 2×10^{10} pfu, est injectée dans la souris.

2.4.2. Quantification par titration

Dans un tube de culture, 10 ml de LB avec de la tétracycline (20 µg/ml) sont inoculés à partir d'une colonie d'*E. coli* d'ER2738 qui provient d'un pétri. Le tube est incubé à 37 °C avec agitation pendant 4 à 8 heures jusqu'à que la culture atteigne la phase mid-log qui correspond à une D.O. d'environ 0,5 à une longueur d'onde de 600 nm. Pendant la croissance bactérienne, on prépare le Top Agar en le faisant fondre au micro-onde. Le Top Agar fondu est distribué dans des tubes de culture stériles pour un volume de 3 ml par tube qui sont gardés à 45 °C. Un tube de Top Agar est préparé pour le nombre de dilutions voulu de la concentration de phages. Les pétris d'IPTG/X-gal contenant 40 µg/ml de tétracycline sont préchauffés à 37 °C jusqu'à l'utilisation pour le titrage. Un pétri est utilisé pour chaque volume de dilution à quantifier. Ensuite, les dilutions des phages sont préparées dans du milieu LB. Pour le titrage des phages sélectionnés et amplifiés, il est conseillé de faire des dilutions de 10^{-8} à 10^{-11} . Pour le titrage des phages sélectionnés non amplifiés et le titrage des phages de la présélection, il est conseillé de préparer des dilutions de 1 à 10^{-4} . Les dilutions sont préparées soigneusement afin d'éviter les contaminations croisées. Lorsque la culture bactérienne d'ER2738 atteint la phase mid-log, 200 µl de cette culture est pipetée dans un tube Eppendorf pour chaque dilution préparée. Ensuite, les phages vont infecter les bactéries. Un volume de 10 µl de la dilution de titrage est prélevé et ajouté dans un tube Eppendorf contenant la culture bactérienne. Cette étape est effectuée pour chacune des différentes dilutions à quantifier. Les tubes Eppendorf sont vortexés brièvement et sont incubés pendant 1 à 5 minutes. Les tubes de cellules bactériennes infectées sont transférés séparément aux tubes de cultures correspondants contenant le Top Agar gardé à 45 °C. La solution est vortexée brièvement et est versée immédiatement dans un pétri d'IPTG/X-gal/Tet préchauffé. Le pétri est incliné un peu et tourné pour s'assurer que la solution de Top Agar et de cellules infectées par les phages soit dispersée également sur la surface. Ensuite, les pétris des dilutions sont refroidis pendant 5 à 10 minutes et sont incubés en position inversée à 37 °C pendant la nuit.

Le lendemain, les plaques bleues (phages cibles) provenant des pétris ayant moins de 300 plaques bleues sont comptées. Le compte obtenu est multiplié par le facteur de dilution pour avoir le pfu/10 µl. Pour le titrage des phages sélectionnés du 4^e tour de panning, les pétris sont incubés au maximum pendant dix-huit heures.

2.4.3. Purification de l'ADN des clones de phages

Une culture bactérienne d'*E. coli* ER2738 qui a été incubée toute la nuit à 37 °C est diluée dans du milieu LB dans un ratio de 1 :100. Ensuite, 1 ml de cette dilution de culture bactérienne est ajouté dans un tube de culture. Un tube de culture est utilisé par clone de phage dont l'ADN sera séquencé. Une plaque bleue distincte provenant d'un pétri de titrage gardé moins de trois jour à 4 °C est piquée avec un embout d'une micropipette et ensuite transférée dans un tube de culture. Les tubes de cultures contenant les clones de phages sont incubés à 37 °C avec agitation pendant 5 heures. Les cultures de clones de phages sont transférées dans des microtubes pour être centrifugées à 16 060 g pendant 30 secondes. 500 µl de chaque surnageant de phages sont transférés séparément dans de nouveaux tubes. 200 µl d'une solution de 20 % de PEG/NaCl est ajouté à chacun des tubes. Les tubes sont inversés plusieurs fois pour bien mélanger et sont incubés à température pièce pendant 20 minutes. Après l'incubation, les tubes sont centrifugés à 16 060 g pendant 10 minutes à 4 °C et le surnageant est jeté. Les tubes sont centrifugés une autre fois brièvement pour ensuite enlever le restant du surnageant. Le culot obtenu est resuspendu dans 100 µl de tampon d'iodure et ensuite 250 µl d'éthanol est ajouté. La solution est incubée pendant 20 minutes à température pièce. Suite à l'incubation, les tubes sont centrifugés à 16 060 g pendant 10 minutes à 4 °C et le surnageant est jeté. Le culot obtenu est lavé avec 500 µl d'éthanol 70 % conservé à -20 °C. Le tube est centrifugé à 16 060 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant est jeté et le culot obtenu est séché sous vide brièvement. Le culot d'ADN de clone de phages obtenu est resuspendu dans de l'eau et conservé à -20 °C. Les échantillons d'ADN de clones de phages ont été séquencés par le Centre d'Innovation Génome Québec/Université McGill (Montréal, Qc, Canada) en utilisant l'amorce -96gIII fournie par NEB.

2.4.4. Analyse des séquences

Les fichiers des séquences des clones de phages sélectionnés et leurs peptides exprimés ont été analysés avec le programme de bio-informatique d'analyse de séquence Unipro UGENE (Version 1.11.5) (279). Les séquences d'ADN encodant les peptides ont été alignées par le logarithme ClusterW pour voir la similarité entre les séquences. Les séquences d'ADN ont ensuite été traduites en séquences d'acides aminés.

2.5. Immunohistochimie

2.5.1. Préparation des échantillons

L'organe cible, la racine aortique, d'une souris ATX ayant développé une sténose valvulaire aortique, est prélevé. Des organes contrôles tels que le rein, le foie, les poumons, le ventricule et la rate sont prélevés en même temps. Les organes sont gardés à 4°C jusqu'à la fixation par congélation et sont inclus dans le médium Neg-50 (Richard-Allan Scientific) comme OCT (*optimal cutting temperature compound*). L'organe est enrobé d'OCT en enlevant les bulles d'air dans un moule de plastique identifié. Le moule contenant l'organe est plongé rapidement dans l'isopentane refroidi sur glace sèche et laissé jusqu'à congélation complète de l'OCT. Les échantillons gardés dans leur moule respectif sont conservés à -80°C. La racine aortique est coupée au cryostat (Leica CM1580UV) à -20 °C pour avoir des coupes d'une épaisseur de 7 µm. Les coupes de la racine aortique sont coupées dans le sens transversal afin de pouvoir voir les trois feuillets. Un minimum de deux coupes sont présentes par lame *Superfrost plus* (Fisher Scientific, #cat 12-550-15). Les organes contrôles sont coupés à -20 °C, excepté pour le poumon qui l'a été à -25 °C. Les lames sont conservées à -20 °C.

2.5.2. Protocole d'immunohistochimie

Les lames utilisées pour le marquage sont fixées dans un bain d'acétone froid, préalablement conservé à -20°C, pendant 20 minutes. Les lames sont lavées dans un bain de TBS deux fois pendant 5 minutes. Les coupes d'organes sur les lames sont encerclées avec un crayon gras ImmEdge Pen (Vector Laboratories, # cat H-4000). L'activité peroxydase

endogène est bloquée avec une solution de H₂O₂ 3 % dans de l'eau déminéralisée pendant 5 minutes. Les lames ne sont pas rincées ensuite. Les coupes de tissus sont bloquées dans un bain de 20 minutes contenant 10 % de sérum normal de chèvre (SNC, Vector Laboratories, # cat S-1000) dans du TBST (contient 0,1 % Tween-20). Cette étape de blocage permet d'éviter d'avoir des liaisons non-spécifiques des phages et de l'anticorps anti-phage. Les lames sont ensuite lavées deux fois, 3 minutes avec du TBS. Les coupes sont individuellement incubées avec 100 µl d'une solution de phages exprimant les peptides d'intérêts (2x10¹¹ pfu) dans 1 % de SNC et de TBS à 4 °C toute la nuit. Chaque lame teste un des phages exprimant une des séquences peptidiques trouvées. Le lendemain, les lames sont lavées dans 10 bains de 3 minutes avec du TBST (0,1 % Tween-20) et ensuite trois bains de 3 minutes avec du TBS. À partir de cette étape, les lames des différents phages testés sont lavées séparément afin de ne pas avoir de contaminations croisées entre les phages lors de l'étape de révélation. Les lames des coupes sont ensuite incubées avec 100 µl d'une solution de TBS, 1 % SNC contenant l'anticorps polyclonal de lapin anti-M13 (Dilution 1 : 1000; Thermo Scientific. # cat PA1-26758) dans du TBS/1 % SNC pendant 1 heure à température pièce. Ensuite, les lames sont lavées pendant 5 minutes, 3 fois avec du TBS. Les lames de tissus sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin IgG (H+L) conjugué avec de la biotine (Dilution 1 :1000, Vectashield, #cat BA-1000) dans du TBS/ 1 % SNC pendant 1 heure à température pièce. Les lames sont lavées dans trois bains de 5 minutes dans du TBS. Les coupes sont ensuite incubées avec la solution Vectastain *Elite* ABC Reagent Kit Standard (Vectastain Laboratories, # cat PK-6100). La solution est préparée au moins 30 minutes avant son utilisation en mélangeant 2 gouttes (100 µl) du *REAGENT A* dans 5 ml ml de TBST. La solution est ensuite mélangée avec 2 gouttes (100 µl) de *REAGENT B*. Les lames de coupes de tissus sont lavées par trois bains de 5 minutes avec du TBS. Les coupes sont ensuite incubées avec la solution ImmPACT AEC (*ImmPACT AEC peroxydase substrate kit*, Vectastain Laboratories, # cat : SK-4205) jusqu'à l'apparition de marquage rouge par le complexe de peroxydase qui révèle les phages liés. La solution d'ImmPACT AEC est préparée en mélangeant 2 gouttes de *Buffer stock* dans 5 ml de diluant ImmPACT AEC. 3 gouttes de la solution stock AEC est ajoutées pour mélanger la solution. 2 gouttes d'H₂O₂ sont ajoutées à la fin et la solution est mélangée par agitation. L'incubation avec la solution est arrêtée lorsqu'il y a coloration sur les coupes des contrôles négatifs en faisant deux bains de 5 minutes dans du

TBS. Les coupes ont été contre-colorées rapidement avec l'hématoxyline (Mayer's solution d'hématoxyline, Sigma-Aldrich, # cat MHS32) et rincées à l'eau du robinet. Les lames sont lavées deux fois 1 minute dans l'eau déminéralisée. Les lames sont montées en montage aqueux avec du médium VectaMount Aq (Vector Laboratories, # cat H-5501) et sont ensuite séchées à l'air toute la nuit. Les lames sont regardées au microscope (Olympus BX41 et caméra Olympus Q-Color 3, Olympus America, Canada) à différents grossissements. Les lames de contrôles négatifs sont effectuées en utilisant le phage M13 contrôle de type sauvage qui n'a pas d'insert de peptide (New England Biolabs, # cat N0316S). La liaison des phages sur les sections de tissus est évaluée en comparant l'intensité relative du marquage des phages spécifiques par rapport au contrôle.

2.6. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de la valeur moyenne \pm l'écart type. Pour comparer l'aire de la valve aortique de la souris, le poids et les autres paramètres échocardiographiques entre les deux groupes (14,7 vs 19,6 mois), un test de Student T est utilisé. Une valeur de ≤ 0.05 est considérée significative.

Contribution de l'étudiant

L'article qui suit comprend la majeure partie de mes travaux de maîtrise. Le premier auteur a été impliqué dans la conception et l'optimisation des méthodes utilisées, tout le travail relié aux phages, l'amplification des phages, l'analyse des séquences, les coupes de tissus, les marquages d'immunohistochimie et l'analyse des immunohistochimies.

Les coauteurs ont principalement contribué par leur expertise et assistance dans les manipulations *in vivo* avec les souris ou pour leur conception du projet, la supervision et la direction dans ces travaux. Yan-Fen Shi a effectué les mesures échocardiographiques *in vivo* de l'aire de la valve aortique. Téodora Mihalache-Avram a effectué les injections dans les souris, le prélèvement des organes et a aidé à la conception et à la supervision du protocole d'immunohistochimie avec les phages. Mélanie Mecteau a aidé à la conception du protocole de la sélection *in vivo* chez la souris. Gabriel Théberge-Julien a aidé à l'initiation et la conception du projet. Les Dr. Éric Rhéaume et Jean-Claude Tardif ont dirigé et supervisé mes travaux.

L'article sera soumis au journal *Journal of Cardiovascular Pharmacology*

***In vivo* phage display screening using a mouse model of aortic valve stenosis for the discovery of new homing peptides to the aortic valve**

Kurunradeth Uy, Teodora Mihalache-Avram, Gabriel Théberge-Julien, Yan-Fen Shi, Mélanie Mecteau, Eric Rhéaume and Jean-Claude Tardif

Correspondence to Dr. Jean-Claude Tardif, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8

Short running title: Discovery of peptide sequences for aortic valve homing

Keyword: in vivo phage display, aortic valve stenosis, animal model

Number of figures: 3

Number of tables: 5

Abstract

Background

Aortic valve stenosis (AVS) is the most prevalent valvular heart disease that affects the elderly in developed countries. The active disease process is characterized by lipid deposition, inflammation, fibrosis and active leaflet calcification that progress into the thickening and stiffening of the aortic valve, decreasing the aortic valve orifice. We hypothesized that the pathogenesis of AVS causes the expression of disease-specific valvular biomarkers that are accessible through blood circulation.

Approach and Results

Here, we report the use of *in vivo* phage display screenings using random peptide libraries to discover new peptide candidates that target impaired aortic valves in mice. Old *Ldlr*^{-/-};Tg(hApoB^{+/+}) mice with AVS were used for the *in vivo* screening of linear 7 amino acids and constrained random peptide libraries. After 4 rounds of screening, we characterized 14 different phages that were separated in 5 repeated consensus motifs for the linear heptapeptide library and 11 different phages representing 5 different consensus motifs for the constrained library.

Specificity of 4 candidate phages from the linear library and 5 phages from the constrained library was studied by immunostaining of phages displaying the consensus peptide sequence of interest in tissue slices of aortic valve compared to control tissues from liver, kidney, ventricle, spleen and lungs. Among those, 4 phages represent interesting candidate peptides that will need to be further tested to validate their specificity.

Conclusions

Although further validation remains to be performed, the candidate homing peptides found could represent useful molecular imaging agent or therapeutic delivery carrier to diseased aortic valves.

Introduction

Aortic valve stenosis (AVS) is the most prevalent valvular heart disease in developed countries affecting 2-3% of the population over 65 years old.^{1, 2} The progression of severe symptomatic AVS leads to considerable morbidity and death in less than 5 years if left untreated.³ The current primary treatment approaches for AVS is open heart surgery and, recently, percutaneous replacement of the valve.^{2, 4, 5} Studies show that AVS and atherosclerosis share common risk factors like hyperlipidemia, age, hypertension and smoking but the pathophysiology and progression of AVS are not fully understood yet.^{5, 6} For instance, clinical trial with statins treatment, used and beneficial for atherosclerosis, showed that such treatment could not prevent the progression of AVS, which highlight the fact that the two pathologies are different.⁷ Our group has shown that therapy based on a mimetic peptide of apolipoprotein A-I (apoA-I), the main protein of HDL particles, could lead to regression of experimental aortic valve stenosis in mice and rabbits^{8, 9}. Although the efficiency of such therapy in human still awaits validation, we believe that the high cost of such therapy could limit its use.

First thought to be a degenerative disease, studies have shown that AVS result from an active process characterized by lipid deposition, inflammation, extracellular matrix remodelling and an active leaflet calcification.¹⁰ The progression of the disease leads to the thickening and stiffening of the aortic valve leading to an abnormal narrowing of the aortic valve area which results in an impaired blood circulation.^{2, 5, 10-15} The aortic valvular endothelium is progressively modified at each stage of AVS.¹⁰ It was demonstrated in the early stage of the disease that the endothelial damage to the aortic valve leads to an infiltration of inflammatory cells and lipids. The resulting inflammatory activity affects the aortic valve environment leading to fibrosis and calcification of the tissues.^{5, 10} We believe that changes to valvular endothelium and desendothelialization could be accompanied by expression of unique tissue and diseased-specific biomarkers. The presence of these specific valvular markers could therefore be used as target for molecular imaging agent to monitor AVS or as drug targets, for instance, peptides targeting these specific aortic valve markers could

possibly be coupled with the apoA-I mimetic peptide to increase its therapeutic efficiency while decreasing the amount of peptide needed and the cost for treatment.

Among the various strategies used to find peptides that selectively bind to pathological tissues in different diseases, the phage display technique is probably the most commonly used. Phage display is known as a screening technique to uncover specific binders against a target. This approach makes use of highly diverse random peptide libraries expressed on the surface of a population of genetically modified phages to allow interaction with the protein of interest.¹⁶⁻¹⁹ Various studies with this rapid and sensitive method have shown success in finding novel specific peptide ligands that are able to bind to targeted disease marker proteins that are accessible via the systemic circulation within a defined pathological microenvironment.^{17, 18, 20-29} Thus, we hypothesized that an *in vivo* panning with phage display will be able to specifically target specific markers expressed on the surface of the aortic valve affected by AVS. To target these specific molecules, we used old *Ldlr*^{-/-};Tg(hApoB^{+/+}) (ATX) mice similar to the transgenic *Ldlr*^{-/-};Tg(*ApoB*^{100/100}) mice that were previously shown to develop features mimicking the clinical syndrome of AVS³⁰ for the *in vivo* screenings of linear and constrained random heptapeptide libraries.

Here, we report the discovery of peptide sequences that can bind to diseased aortic valves in mouse. Further characterisation of 9 phage clones chosen from two screened libraries were performed to study their specificity by the immunodetection of the phage binding in diseased aortic valve tissues compared to control tissues. Although further validations remains to be performed, our results lead to 4 candidate peptide sequences that may specifically bind the aortic valve of old ATX mice that have potential as a molecular imaging agent or as therapeutic drug carrier targeting diseased aortic valves.

Materials and methods

Materials and Methods are available in the online-only Supplement

Animal and experimental procedures

All experimental procedures and animal care were performed according to the Canadian Council on Animal Care guidelines and the study protocol was approved by the Montreal Heart Institute (MHI) Ethic Committee for animal research. A total of 27 male atherosclerotic (ATX) mice (C57Bl/6 X 129Sv/Ev X SJLJ-*Ldlr*^{-/-};Tg(hApoB-100^{+/+})) aged between 16-22 months old were obtained from Dr Eric Thorin (MHI) and used for the phage screening and immunohistochemistry experiments. The ATX mice expressed a human apolipoprotein B-100 transgene [Tg(ApoB^{+/+})] and are LDL receptors deficient (*Ldlr*^{-/-}).³¹ ATX mice were fed with a normal standard diet (Tecklad 2014S, Harlan Laboratories, Montreal, Qc, Canada). Tissues from nine C57Bl/6 mice aged 3 months were used for the immunohistochemistry experiments.

Echocardiography

During echocardiographic measurement, isoflurane was used as a sedative for the mice (2.5% in 500 ml of O₂ min⁻¹, Abbot Laboratories, Montreal, Qc, Canada). Echocardiography data acquisition was carried out with an i13L transducer (10-14 Megahertz) on a Vivid 7 Dimension system (GE Healthcare Ultrasound Horten, Vestfold, Norway). Left ventricular outflow tract (LVOT) diameter was measured in a zoomed parasternal long-axis view, and LVOT cross-sectional area (CSA_{LVOT}) was calculated according to: $CSA_{LVOT} = \pi (LVOT \text{ diameter}/2)^2$. LVOT velocity (V_{LVOT}) and velocity-time integral (VTI_{LVOT}) were obtained with pulsed-wave. Doppler was sampled proximally to the aortic valve in the apical five-chamber view. Continuous wave Doppler interrogation across the aortic valve was used to obtain transvalvular maximal velocity (V_{AV}) and VTI (VTI_{AV}) in the same view. Aortic valve area (AVA) was calculated by the continuity equation and was equal to $CSA_{LVOT} \times (VTI_{LVOT}/VTI_{AV})^8$. The average of three consecutive cardiac cycles was used for each measurement. All echocardiographic imaging and measurement were performed throughout the protocol by an experienced investigator.

***In vivo* screening**

The commercial phage display library Ph.D.-C7C, which consist of 7 random amino acid constrained sequence, and the Ph.D.-7 library, which display random linear 7-mer peptides, (New England Biolabs, Ipswich, MA, E8120S and E8100S respectively) were used for 2 independent *in vivo* screenings of the aortic valve. During the screening procedure, ATX mice were anaesthetized by isoflurane and injected with heparin (100 U/kg). The M13-based phage libraries (2×10^9 individual clones) were initially injected into the tail vein of two separate ATX mice at a concentration of 2×10^{11} plaque forming units (pfu)/150 μ l and were allowed to flow in the systemic circulation for 5 minutes. Each mouse was then sacrificed and perfused via the heart using physiologic pressure with saline solution until blood was cleared off organs. The aortic valves and the liver were then excised, snap-frozen, washed in sterile phosphate buffered saline (PBS), weighed and homogenized in 1 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 1% bovine serum albumin (BSA Fraction V, Fisher Scientific, BP1605-100) and 1% Cocktail Protease Inhibitor (Sigma, P2714). Tissue homogenates were then used to infect *Escherichia coli* ER 2738 bacteria (New England Biolabs, Ipswich, MA, E8120S) for the amplification of binding phages that were retrieved for the following round of screening. This panning process was repeated 3 more times to select the best phages from each library. To increase the stringency of the screening for the 4th round, 1×10^{10} pfu of the amplified phage library were injected in the mouse.

After the 4th and final round of screening, individual phage plaques forming unit were randomly selected from each library and amplified to identify the specific peptide sequences from their genomes. Phages DNA were sequenced by the McGill University and Génome Québec Innovation Center (Montreal, Canada) using the -96 gIII sequencing primer (5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3').

Histology

After the sacrifice, the mice aortic valves, lungs, livers, kidneys, spleens and left ventricles were excised and immediately frozen in optimal cutting temperature

(O.C.T.) compound (Neg-50 frozen section medium, Richard-Allan Scientific) at -80°C and cross-sectioning was performed to obtain 7-µm-thick slices. The aortic valve sections present the sinus wall and valve leaflets. The frozen sections were placed on slides and stored frozen until use. For the assessment of calcification, tissue sections were stained with von Kossa stain and counterstained with nuclear Fast Red.

Immunohistochemistry for assessment of tissue-specific phage binding

The frozen sections of tissues were fixed with ice-cold acetone for 20 minutes. After rehydration in Tris-buffered saline (TBS), the sections were incubated 5 minutes at room temperature (RT) with 3% hydrogen peroxide, followed by a washing in TBS and then blocking with a solution of TBS containing 0.1% Tween-20 (TBST) containing 10% normal goat serum (Vector Laboratories, S-1000) for 1 h. Then, each phage clone (2×10^{11} pfu) was individually incubated on the different tissue slides for 18 h at 4°C in 0.1% TBST containing 1% serum. To prevent cross-contamination from other tested phage clones, the slides were washed separately 10 times in TBST and 3 times in TBS. The rabbit anti-M13 polyclonal antibody (Thermo Scientific, PA1-26758) was used to detect phages binding using a 1:1000 dilution in TBS containing 1% serum for 1 h at RT. Following 3 washes in TBS, the tissues were incubated with a goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody conjugated with biotin (1:1000, Vectashield, BA-1000) in TBS containing 1% serum for 1 h at RT. After 3 washes in TBS, the slides were incubated with Vectastain *Elite* ABC Reagent (Vector Laboratories, PK-6100). Tissues sections were stained in red-brown color using ImmPACT AEC peroxidase substrate kit (Vector Laboratories, SK-4205) and counterstained with Mayer's hematoxylin solution (Sigma-Aldrich, MHS32). Phage binding to tissue sections was evaluated by the intensity of immunostaining relative to the controls. Negative control slides were made using wild-type M13 phage without peptide insert (New England Biolabs, N0316S) during the same immunohistochemistry experiments. Positive control slides were made by incubating one of the positive binding phage on ATX mice aortic valve during the same immunohistochemistry experiments on healthy aortic valve tissues as a reference of staining reaction.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SD or median. To compare AVA, weight and other echocardiographic parameters between groups (young vs. old) a Student's T test was performed. A value of $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Progression of aortic valve stenosis in old ATX mice (*Ldlr*^{-/-};Tg(hApoB^{+/+}))

We first assessed the progression rate of AVS in old ATX mice (*Ldlr*^{-/-};Tg(hApoB^{+/+})) with echocardiographic measures to monitor the change in the aortic valve function. The results showed a significant decrease ($P \leq 0.05$) of the AVA in ATX mice at the mean age of 19.6 months compared to the AVA measured for the relatively younger group at 14.7 months: (median with q1-q3) $0.396 \pm 0.056 \text{ mm}^2$ vs. $0.486 \pm 0.091 \text{ mm}^2$ (Figure 1). A decrease of $18.5 \pm 11.5 \%$ was therefore observed in the AVA of the 5 months older ATX mice.

Presence of calcification in aortic valve tissue of ATX mice

We also evaluated the calcification of the aortic valve of ATX mice at the mean age of 18.0 months by von Kossa staining. We observed black-brown staining representing calcium deposition in the plaques present on the valve leaflet tissues of the ATX mice (Figure 2).

Sequential enrichment of phages homing to the diseased aortic valves in old ATX mice

Our *in vivo* screenings were performed in ATX mice of 18.0 ± 2.2 months. We documented the number of phages recovered per tissue mass as a measure of the enrichment occurring at each round of *in vivo* screening. An increase in phage recovery specific to the aortic valve of approximately 37-fold was observed at the end of the last round of screening when compared to the yield at the first round for the linear peptide library (Figure 3A) and about 42-fold for the constrained peptide library (Figure 3B).

Sequential recovery of phages homing to the liver in old ATX mice

During the *in vivo* screenings process, we quantified the number of phages recovered per tissue mass of the liver as a control for the enrichment occurring at the first three rounds of screening. A decrease in phage recovery from the liver of about 50% was observed at the third round for the linear peptide library (Figure 4A). A

diminution close to 100 % was seen for the constrained peptide library at the third round of screening (Figure 4B).

Characterization of the specific peptide sequences putatively targeting the diseased aortic valves

We randomly selected phage clones from the two different library screenings to characterize the peptide sequences of the phages obtained from aortic valve tissue. We obtained 14 different peptide sequences from the linear library and 11 from the constrained library (Table 1). The 14 different phage clones from the linear library can be separated in 5 consensus motifs and the 11 different phages from the constrained library can also be separated in 5 different motifs.

Localization of phage binding sites in diseased aortic valve tissues

We then validated the binding affinity to the aortic valve from old ATX mice of each discovered phage clones using immunohistochemistry. Frozen sections of ATX mice aortic valves tissues were overlaid with phage clones. Phage binding to the diseased aortic valve tissue was detected using an anti-M13-phage antibody. The red-brown staining was considered positive if its intensity was greater than that of control insertless M13 phage incubated and revealed using the same conditions as detailed in the Material and methods section. Figure 5A and 5B show examples of aortic valve binding from a phage expressing peptide candidate from the linear (M2.L1) and one from the constrained library (M1.C1), respectively. The staining intensities of the constrained phage clones were weaker in general compared to the phages obtained from the linear library. Black tissue pigmentation associated with the C57BL/6J genetic background is seen in certain areas of the aortic valve leaflets and does not represent immunohistochemical staining. No significant immunostaining could be detected in the aortic valve for the linear peptide phage library clones M1.L1, M3.L1, M3.L2 and M4.L1 (Table 2). The selection from linear library resulted in 9 phages candidates that bind to the aortic valve leaflet, Valsalva's sinus and plaque area of aortic valve tissues while linear phage clone M2.L7 only binds to plaque area of the aortic valve. All candidate phage clones of the constrained peptide library

immunostaining analysis show a similar binding pattern to the ATX mice aortic valve, valve leaflets and Valsalva's sinus and plaques (Table 3). A total of 20 phage clones showed binding affinity to the aortic valve tissues of ATX mice.

Non-specific binding of phage clones to control organs of ATX mice

To assess the specificity of binding of the phages, we then selected 4 candidate phage clones (M2.L2, M2.L2, M2.L6 and M5.L2) from the linear library and 5 (M1.C1, M1.C3, M2.C1, M3.C1 and M4.C2) from the constrained library and characterized their binding on frozen tissue slices from kidney, lung, liver, spleen and ventricle from ATX mice in comparison with control insertless phage. Immunostaining results indicate that no non-specific binding was detected in the control organs for phage clones M1.C1, M1.C3, M3.C1 and M4.C2 (Table 4). The phage clones M2.L2, M2.L3 and M5.L2 bind to lung tissues. The staining results indicate binding to heart left ventricle for the phage clones M2.L1, M2.L2 and M2.C1. Therefore our results indicate that only the 4 phage clones M1.C1, M1.C3, M3.C1 and M4.C2, all from the constrained library screening, are specific to the aortic valve.

Non-specific binding of phage clones to healthy aortic valve tissues

We validated the specificity of the 4 constrained phage clones M1.C1, M1.C3, M3.C1 and M4.C2 to the pathological aortic valve tissues by assessing their binding affinity to healthy aortic valve frozen tissues of C57Bl/6 mice by using the insertless M13 phage as a negative control. A phage was used as a positive control on the ATX mice aortic valve tissue for reference of the binding time. The immunostaining results show the absence of non-specific binding to the normal aortic valve tissues for the 4 phages clones selected (Figure 6 and Figure 7).

Homology of selected phage peptides motifs to murine proteins

We investigated the homology of the four remaining peptides to known mouse proteins using BLAST algorithm search with the mouse nonredundant protein database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). By assessing the sequence matches obtained from the four peptide motifs that demonstrated binding to the mouse aortic valve

tissues, we identified a number of interesting candidates that have biofunctional relevance to the pathology of AVS. We compiled a list of murine candidate proteins sharing similar motifs to the aortic valvular-homing peptides obtained by phage display screening (Supplementary Table 1). The STRING database (<http://string-db.org>) was used to predict proteins interactions of found homologue proteins related to AVS.

Discussion

In this paper we applied the *in vivo* phage display screening in a murine model of AVS, old atherosclerotic mice (*Ldlr*^{-/-};Tg(hApoB^{+/+})), to discover novel candidate peptides that could specifically bind the aortic valve. Our mice model shares a similar genetic background to a mice model previously shown to develop AVS with old age.³⁰ This previous study revealed a drastic reduction in the valve orifice diameter in hypercholesterolemic mice aged of 20 months which corroborate with our echocardiographic results showing the progression of AVS in ATX mice around a similar age. Aortic valve calcification was observed in the sinuses of Valsalva and in the plaques of these old ATX mice. The development of AVS in the ATX mouse model is attributed to their old age and the fact that they are prone to develop spontaneous atherosclerotic lesions, two important risk factors for aortic valve stenosis in human.^{6, 32}

We performed two sequential pannings using two different phage libraries: one composed of random 7-mer linear peptides and a constrained heptapeptide library. The heterogeneous phage populations were allowed to circulate in old ATX mice before the phages that bound to the aortic valve could be rescued, amplified and then re-injected in a different ATX mice and the process was repeated for a total of 4 times. The whole screening experiments achieved a 37- and 42-fold increase of specific phage recoveries from the aortic valve for the linear and constrained libraries, respectively, which is consistent with other studies reporting enrichment of tissue-specific phages.^{17, 24, 33} A decrease in the recovery of phages from the liver at the third round may be explained by the reduction of non-specific phage binding to the liver for the linear and constrained peptide libraries screenings due to enrichment of phages targeting the aortic valve at each round. Non-specific accumulation of phages to the liver has been previously seen in others phage display studies. Liver phage accumulation is expected as the liver is part of the reticulo-endothelial system where non-specific phage clearance mostly occurs.^{17, 34, 35} Such decrease in non-specific accumulation in the liver was expected in order to validate the enrichment of phages having specific homing to the aortic valve of ATX mice. The sequence analysis of

phage clones from each library picked at round 4 revealed 25 different peptide sequences that can be separated into different consensus motifs indicating that the different phages do not bind to the same target²⁶ and that the surface of the aortic valve in ATX mice may expressed multiple different specific molecules that can be targeted via the systemic circulation.

We validated the binding of the different candidate phages to aortic valve tissues of old ATX mice. Our immunohistological analysis revealed that 20 out of 25 phages bind to the valve. In this assay, the identity of the black pigmentation observed might be melanocytes³⁶, or lipofuscin-containing granules³⁷ that can appear on the valve interstitium of the C57BL/6J mouse background³⁸ and are not to be mistaken with the red/brown staining indicating phage binding.

In Figure 5, we presented two phage candidates that display the most common motif from each group to compare the library binding affinity to the aortic valve. The visualisation of the linear phage clone M2.L1 staining is more intense compared to staining for the constrained clone M1.C1 on the diseased aortic valve. One possible reason is that M2.L1 phage clone targets a biomarker present at higher levels on the diseased aortic valve. It might also indicate that M1.C1 clone display specific affinity for a molecule less expressed in the aortic valve. It has been shown that the commonly stronger binding affinity of the constrained peptides library is due to their loop structure which exhibit less structural sequence conformations for target interactions compared to the plasticity of the linear peptide library.³⁹

We proceeded to further characterize the possible non-specific binding of 9 selected phage clones that showed aortic valve staining by immunohistological analysis. The analysis indicates that there were 5 of the 9 candidates that showed binding in the lungs or the ventricle. There is a possibility that their targets are molecules also expressed in the lungs or the ventricle. An *in vivo* phage display study on the mouse heart vasculature also reported non-specific binding for the lung.³³ This might be due to the co-development of the heart and the lung for the cardiopulmonary system during the embryonic stage. A study of a population of multi-potent cardiopulmonary mesoderm progenitor cells demonstrated that the two tissues share

some common progenitor cells. Despite the fact that the two phage clones M2.L1 and M2.C1 also show binding on the ventricle tissues, they might have an interesting value as drug carrier or as molecular imaging agent targeting not only the aortic valve but also the left ventricle. It is known for instance, that left ventricle hypertrophy frequently occurs in late stage AVS.¹⁰ Our results also reveal that the phage clones M1.C1, M1.C3, M3.C1 and M4.C2 (representing the sequences CIGNSNSSC, CTGNSNSSC, CSWQIGGNC and CTVTRTSADC, respectively) did not bind to any of the control organs. These 4 phage clones were then chosen and we assessed whether their homing specificity is able to distinguish between normal and pathological aortic valve tissues. A positive control phage was incubated on diseased aortic valve of ATX as a control for the duration time of staining reaction on healthy aortic valve tissue, all performed in parallel. Our immunostaining analysis indicates that the 4 candidates do not bind to healthy aortic valve tissue and are only specific to markers presents in the diseased aortic valve of the ATX mice model of AVS. Some of the 4 phage clones that we discovered might bind to molecules present under the endothelium due to the fact that they show binding to plaque present in the valsalva sinus. Lipid infiltration occurs in the aortic valve as a result of mechanical stress and endothelial lesions.¹⁰ The endothelial lesions on the diseased aortic valve could allow the infiltration of phages during the screening process to bind markers normally present beneath the endothelium.¹⁰ In terms of specific binding to the tissues of interest, the constrained library showed higher success for the *in vivo* screening in ATX mice by discovering 4 unique unknown makers that specifically bind to the surface of diseased aortic valve compared to the linear screening.

Using BLAST searches, we identified proteins that shares similar motifs with the four phages clone peptides showing specificity for the aortic valve tissues. The candidate clone M1.C1 shares homology with Lrp1 (prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1), a receptor present at the surface of macrophages.⁴⁰ Lrp1 protects against atherosclerosis by decreasing inflammation and facilitating efferocytosis.^{40, 41} The BLAST results indicates that the phage clones M1.C1 shares homology with a motif present in the LDL-receptor class A 11 of Lrp1 exposed on the

cell surface. A possible target of the peptide expressed on this phage is MMP9 that is secreted by macrophages that play a role in the degradation of elastic fibers.⁴²⁻⁴⁴ The connective tissue growth factor (CTGF) is another interesting target for Lrp1.⁴⁵ CTGF expression is induced by TGF- β induce the expression of CTGF, known for playing a central role in tissue remodelling, fibrosis and the activation of myofibroblastes.^{46, 47} Another Lrp1 ligand is the high-temperature requirement factor A a secreted serine protease in vascular smooth muscle cells that has the ability to degrade the elastic layer of the matrix.⁴⁴ The M1.C3 candidate share homology with a motif of Tnfrs11a (tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A precursor), a protein also known as RANK, which plays a role in the RANK/RANKL/OPG axis regulating the differentiation, activation and survival of osteoclasts in the calcification process of AVS.^{10, 48, 49} M1.C3 demonstrates more binding in the plaque regions, the regions of the aortic valve where most calcification occurs. Adam17 (a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 isoform 4) is another potential protein with a homology motif for M1.C3. Adam17 cleaves the membrane-bound form of TNF- α to its mature soluble form. It is implicated in the activation of the NOTCH pathway and plays a regulating role in tissue injury and homeostasis.⁵⁰ M1.C1 and M1.C3 also have homology with Maml1 (mastermind-like protein 1) and Foxc1 (forkhead box protein C1). Maml1, is a transcription coactivator for NOTCH proteins.⁵¹ The NOTCH pathway is implicated in the calcification process of AVS.^{10, 52, 53}

The immunohistochemical results of the phages clones M1C.1 and M1.C3 indicate intracellular staining. This shows that the phage clones can access to the intracellular part of the NOTCH receptor possibly by entering through the endothelial lesions presents in the aortic valves. The pathological cells might express at his surface the intracellular proteins which make it accessible for the phages. Foxc1 is a protein know to interact with MMP7 (matrix metalloproteinase 7), an enzyme known to play a role in the remodelling of AVS.⁵⁴ The M3.C1 candidate has homology with Klf13 (Krueppel-like factor 13), a protein that interacts with c-Maf to positively regulate interleukin-4, which plays a role in the inflammation of atherosclerosis.^{55, 56} The protein Adamts1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1

precursor) also has homology with M3.C1 and has been shown to promote atherogenesis and to be located in human atherosclerotic lesions.⁵⁷ Adamts8 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 8 precursor) is another homologue protein for M3.C1 with a role in the inflammatory process and is expressed in macrophage-rich areas of atherosclerotic plaques.⁵⁸ The clone M4.C2 shares homology with Adamts3 (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 3 isoform 2 precursor) which is known to interact with TGF- β 1. Studies have shown that this protein promotes the calcification of aortic interstitial valves cells.⁵⁹⁻⁶¹ Another interesting homologue for M4.C2 is Tlr3 (toll-like receptor 3 precursor), a receptor that induces osteogenic responses in human AVICs through the NF- κ B and ERK1/2 pathways.^{62, 63} Further study would be needed to identify the target proteins of our candidate peptides.

To our knowledge, this is the first time that peptides demonstrating specific homing to the AVS aortic valve are being identified. Although the identity of each peptide target peptide is still unknown, our results indicate that these peptides could potentially be used for practical application such as molecular imaging tools or carrier of therapeutic drugs to the diseased aortic valve.^{24, 64-68} However, further characterization studies will be needed where the 4 interesting peptides should be synthesized and labeled in order to study their biodistribution, pharmacokinetics and potential for *in vivo* targeting of the aortic valve for their use in future applications.

Acknowledgements

Disclosure

Nonstandard abbreviation and acronyms

AVA

Aortic valve area

AVS

Aortic valvular stenosis

References

1. Arsenault BJ, Boekholdt SM, Dube MP, Rheume E, Wareham NJ, Khaw KT, Sandhu MS and Tardif JC. Lipoprotein(a) Levels, Genotype and Incident Aortic Valve Stenosis: A Prospective Mendelian Randomization Study and Replication in a Case-Control Cohort. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2014.
2. Lung B and Vahanian A. Epidemiology of acquired valvular heart disease. *The Canadian journal of cardiology*. 2014;30:962-70.
3. Carabello BA. Evaluation and management of patients with aortic stenosis. *Circulation*. 2002;105:1746-50.
4. Rozeik M, Wheatley D and Gourlay T. The aortic valve: structure, complications and implications for transcatheter aortic valve replacement. *Perfusion*. 2014;29:285-300.
5. Towler DA. Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease. *Circulation research*. 2013;113:198-208.
6. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW and Otto CM. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997;29:630-4.
7. De Vecchis R, Di Biase G, Esposito C, Ciccarelli A, Cioppa C, Giasi A, Ariano C and Cantatrione S. Statin use for nonrheumatic calcific aortic valve stenosis: a review with meta-analysis. *Journal of cardiovascular medicine*. 2013;14:559-67.
8. Busseuil D, Shi Y, Mecteau M, Brand G, Kernaleguen AE, Thorin E, Latour JG, Rheume E and Tardif JC. Regression of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic peptide infusions in rabbits. *British journal of pharmacology*. 2008;154:765-73.
9. Trapeaux J, Busseuil D, Shi Y, Nobari S, Shustik D, Mecteau M, El-Hamamsy I, Lebel M, Mongrain R, Rheume E and Tardif JC. Improvement of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic therapy is associated with decreased aortic root and valve remodelling in mice. *British journal of pharmacology*. 2013;169:1587-99.
10. Dweck MR, Boon NA and Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60:1854-63.
11. Alexopoulos A, Kaoukis A, Papadaki H and Pyrgakis V. Pathophysiologic mechanisms of calcific aortic stenosis. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*. 2012;6:71-80.
12. Leopold JA. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Circulation Cardiovascular interventions*. 2012;5:605-14.
13. Lindman BR, Bonow RO and Otto CM. Current management of calcific aortic stenosis. *Circulation research*. 2013;113:223-37.
14. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, Schoen FJ, Towler DA, Yoganathan AP and Otto CM. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*. 2011;124:1783-91.

15. Yetkin E and Waltenberger J. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *Int J Cardiol.* 2009;135:4-13.
16. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985;228:1315-7.
17. Pasqualini R and Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature.* 1996;380:364-6.
18. Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, Koivunen E, Pasqualini R and Ruoslahti E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *The Journal of clinical investigation.* 1998;102:430-7.
19. Koivunen E, Arap W, Rajotte D, Lahdenranta J and Pasqualini R. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 1999;40:883-8.
20. Thomas S, Waterman P, Chen S, Marinelli B, Seaman M, Rodig S, Ross RW, Josephson L, Weissleder R and Kelly KA. Development of Secreted Protein and Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Targeted Nanoparticles for the Prognostic Molecular Imaging of Metastatic Prostate Cancer. *Journal of nanomedicine & nanotechnology.* 2011;2.
21. Witt H, Hajdin K, Ijlin K, Greiner O, Niggli FK, Schafer BW and Bernasconi M. Identification of a rhabdomyosarcoma targeting peptide by phage display with sequence similarities to the tumour lymphatic-homing peptide LyP-1. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2009;124:2026-32.
22. Kelly KA, Bardeesy N, Anbazhagan R, Gurumurthy S, Berger J, Alencar H, Depinho RA, Mahmood U and Weissleder R. Targeted nanoparticles for imaging incipient pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS medicine.* 2008;5:e85.
23. Kelly KA, Setlur SR, Ross R, Anbazhagan R, Waterman P, Rubin MA and Weissleder R. Detection of early prostate cancer using a hepsin-targeted imaging agent. *Cancer research.* 2008;68:2286-91.
24. Kelly KA, Nahrendorf M, Yu AM, Reynolds F and Weissleder R. In vivo phage display selection yields atherosclerotic plaque targeted peptides for imaging. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging.* 2006;8:201-7.
25. Newton JR, Kelly KA, Mahmood U, Weissleder R and Deutscher SL. In vivo selection of phage for the optical imaging of PC-3 human prostate carcinoma in mice. *Neoplasia.* 2006;8:772-80.
26. Arap W, Kolonin MG, Trepel M, Lahdenranta J, Cardo-Vila M, Giordano RJ, Mintz PJ, Ardelt PU, Yao VJ, Vidal CI, Chen L, Flamm A, Valtanen H, Weavind LM, Hicks ME, Pollock RE, Botz GH, Bucana CD, Koivunen E, Cahill D, Troncoso P, Baggerly KA, Pentz RD, Do KA, Logothetis CJ and Pasqualini R. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nature medicine.* 2002;8:121-7.
27. Laakkonen P and Vuorinen K. Homing peptides as targeted delivery vehicles. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro.* 2010;2:326-37.
28. Hamzeh-Mivehroud M, Alizadeh AA, Morris MB, Church WB and Dastmalchi S. Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. *Drug discovery today.* 2013;18:1144-57.
29. Valetti S, Maione F, Mura S, Stella B, Desmaele D, Noiray M, Vergnaud J, Vauthier C, Cattel L, Giraudo E and Couvreur P. Peptide-functionalized nanoparticles

- for selective targeting of pancreatic tumor. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014;192:29-39.
30. Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, Young SG and Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2006;114:2065-9.
31. Sanan DA, Newland DL, Tao R, Marcovina S, Wang J, Mooser V, Hammer RE and Hobbs HH. Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:4544-9.
32. Gendron ME, Theoret JF, Mamarbachi AM, Drouin A, Nguyen A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Merhi Y and Thorin E. Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;298:H2062-70.
33. Zhang L, Hoffman JA and Ruoslahti E. Molecular profiling of heart endothelial cells. *Circulation*. 2005;112:1601-11.
34. Houston P, Goodman J, Lewis A, Campbell CJ and Braddock M. Homing markers for atherosclerosis: applications for drug delivery, gene delivery and vascular imaging. *FEBS letters*. 2001;492:73-7.
35. Newton-Northup JR, Dickerson MT, Kumar SR, Smith GP, Quinn TP and Deutscher SL. In vivo bacteriophage peptide display to tailor pharmacokinetics of biological nanoparticles. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*. 2014;16:854-64.
36. Mjaatvedt CH, Kern CB, Norris RA, Fairey S and Cave CL. Normal distribution of melanocytes in the mouse heart. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2005;285:748-57.
37. Mehrabian M, Demer LL and Lusis AJ. Differential accumulation of intimal monocyte-macrophages relative to lipoproteins and lipofuscin corresponds to hemodynamic forces on cardiac valves in mice. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1991;11:947-57.
38. Sider KL, Blaser MC and Simmons CA. Animal models of calcific aortic valve disease. *International journal of inflammation*. 2011;2011:364310.
39. Work LM, Nicol CG, Denby L and Baker AH. In vivo biopanning: A methodological approach to identifying novel targeting ligands for delivery of biological agents to the vasculature. *Methods in molecular medicine*. 2005;108:395-413.
40. Boucher P and Herz J. Signaling through LRP1: Protection from atherosclerosis and beyond. *Biochemical pharmacology*. 2011;81:1-5.
41. Yancey PG, Ding Y, Fan D, Blakemore JL, Zhang Y, Ding L, Zhang J, Linton MF and Fazio S. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 prevents early atherosclerosis by limiting lesional apoptosis and inflammatory Ly-6Chigh monocytosis: evidence that the effects are not apolipoprotein E dependent. *Circulation*. 2011;124:454-64.
42. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E and Michel JB. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and

- activation in human aortic aneurysms. *The American journal of pathology*. 2002;161:1701-10.
43. Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P and Strickland DK. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:15498-503.
44. Muratoglu SC, Belgrave S, Hampton B, Migliorini M, Coksaygan T, Chen L, Mikhailenko I and Strickland DK. LRP1 protects the vasculature by regulating levels of connective tissue growth factor and HtrA1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33:2137-46.
45. Segarini PR, Nesbitt JE, Li D, Hays LG, Yates JR, 3rd and Carmichael DF. The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:40659-67.
46. Lipson KE, Wong C, Teng Y and Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5:S24.
47. Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF and Joly AH. CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2000;32:1805-19.
48. Nagy E, Eriksson P, Yousry M, Caidahl K, Ingelsson E, Hansson GK, Franco-Cereceda A and Back M. Valvular osteoclasts in calcification and aortic valve stenosis severity. *International journal of cardiology*. 2013;168:2264-71.
49. Miller JD, Weiss RM and Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circulation research*. 2011;108:1392-412.
50. Franzke CW, Cobzaru C, Triantafyllopoulou A, Loffek S, Horiuchi K, Threadgill DW, Kurz T, van Rooijen N, Bruckner-Tuderman L and Blobel CP. Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209:1105-19.
51. Oyama T, Harigaya K, Sasaki N, Okamura Y, Kokubo H, Saga Y, Hozumi K, Suganami A, Tamura Y, Nagase T, Koga H, Nishimura M, Sakamoto R, Sato M, Yoshida N and Kitagawa M. Mastermind-like 1 (MamL1) and mastermind-like 3 (MamL3) are essential for Notch signaling in vivo. *Development*. 2011;138:5235-46.
52. Rusanescu G, Weissleder R and Aikawa E. Notch signaling in cardiovascular disease and calcification. *Curr Cardiol Rev*. 2008;4:148-56.
53. Zeng Q, Song R, Ao L, Weyant MJ, Lee J, Xu D, Fullerton DA and Meng X. Notch1 promotes the pro-osteogenic response of human aortic valve interstitial cells via modulation of ERK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33:1580-90.
54. Bosse Y, Miqdad A, Fournier D, Pepin A, Pibarot P and Mathieu P. Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2009;2:489-98.
55. Kwon SJ, Crespo-Barreto J, Zhang W, Wang T, Kim DS, Krensky A and Clayberger C. KLF13 cooperates with c-Maf to regulate IL-4 expression in CD4+ T cells. *Journal of immunology*. 2014;192:5703-9.

56. Davenport P and Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of pathology*. 2003;163:1117-25.
57. Jonsson-Rylander AC, Nilsson T, Fritsche-Danielson R, Hammarstrom A, Behrendt M, Andersson JO, Lindgren K, Andersson AK, Wallbrandt P, Rosengren B, Brodin P, Thelin A, Westin A, Hurt-Camejo E and Lee-Sogaard CH. Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: remodeling of carotid artery, immunohistochemistry, and proteolysis of versican. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:180-5.
58. Wagsater D, Bjork H, Zhu C, Bjorkegren J, Valen G, Hamsten A and Eriksson P. ADAMTS-4 and -8 are inflammatory regulated enzymes expressed in macrophage-rich areas of human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 2008;196:514-22.
59. Wang W, Vootukuri S, Meyer A, Ahamed J and Coller BS. Association between shear stress and platelet-derived transforming growth factor-beta1 release and activation in animal models of aortic valve stenosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34:1924-32.
60. Beaumont J, Lopez B, Hermida N, Schroen B, San Jose G, Heymans S, Valencia F, Gomez-Doblas JJ, De Teresa E, Diez J and Gonzalez A. microRNA-122 down-regulation may play a role in severe myocardial fibrosis in human aortic stenosis through TGF-beta1 up-regulation. *Clinical science*. 2014;126:497-506.
61. Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER, 3rd and Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *The Annals of thoracic surgery*. 2003;75:457-65; discussion 465-6.
62. Lopez J, Fernandez-Pisonero I, Duenas AI, Maeso P, San Roman JA, Crespo MS and Garcia-Rodriguez C. Viral and bacterial patterns induce TLR-mediated sustained inflammation and calcification in aortic valve interstitial cells. *International journal of cardiology*. 2012;158:18-25.
63. Zhan Q, Song R, Zeng Q, Yao Q, Ao L, Xu D, Fullerton DA and Meng X. Activation of TLR3 Induces Osteogenic Responses in Human Aortic Valve Interstitial Cells through the NF-kappaB and ERK1/2 Pathways. *Int J Biol Sci*. 2015;11:482-93.
64. Arap W, Pasqualini R and Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*. 1998;279:377-80.
65. Greig JA, Shirley R, Graham D, Denby L, Dominiczak AF, Work LM and Baker AH. Vascular-targeting antioxidant therapy in a model of hypertension and stroke. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2010;56:642-50.
66. Scaringi C, Minniti G, Caporello P and Enrici RM. Integrin inhibitor cilengitide for the treatment of glioblastoma: a brief overview of current clinical results. *Anticancer research*. 2012;32:4213-23.
67. Deutscher SL, Figueroa SD and Kumar SR. In-labeled KCCYSL peptide as an imaging probe for ErbB-2-expressing ovarian carcinomas. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals*. 2009;52:583-590.
68. Knetsch PA, Petrik M, Griessinger CM, Rangger C, Fani M, Kesenheimer C, von Guggenberg E, Pichler BJ, Virgolini I, Decristoforo C and Haubner R. [68Ga]NODAGA-RGD for imaging alphavbeta3 integrin expression. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2011;38:1303-12.

Figures

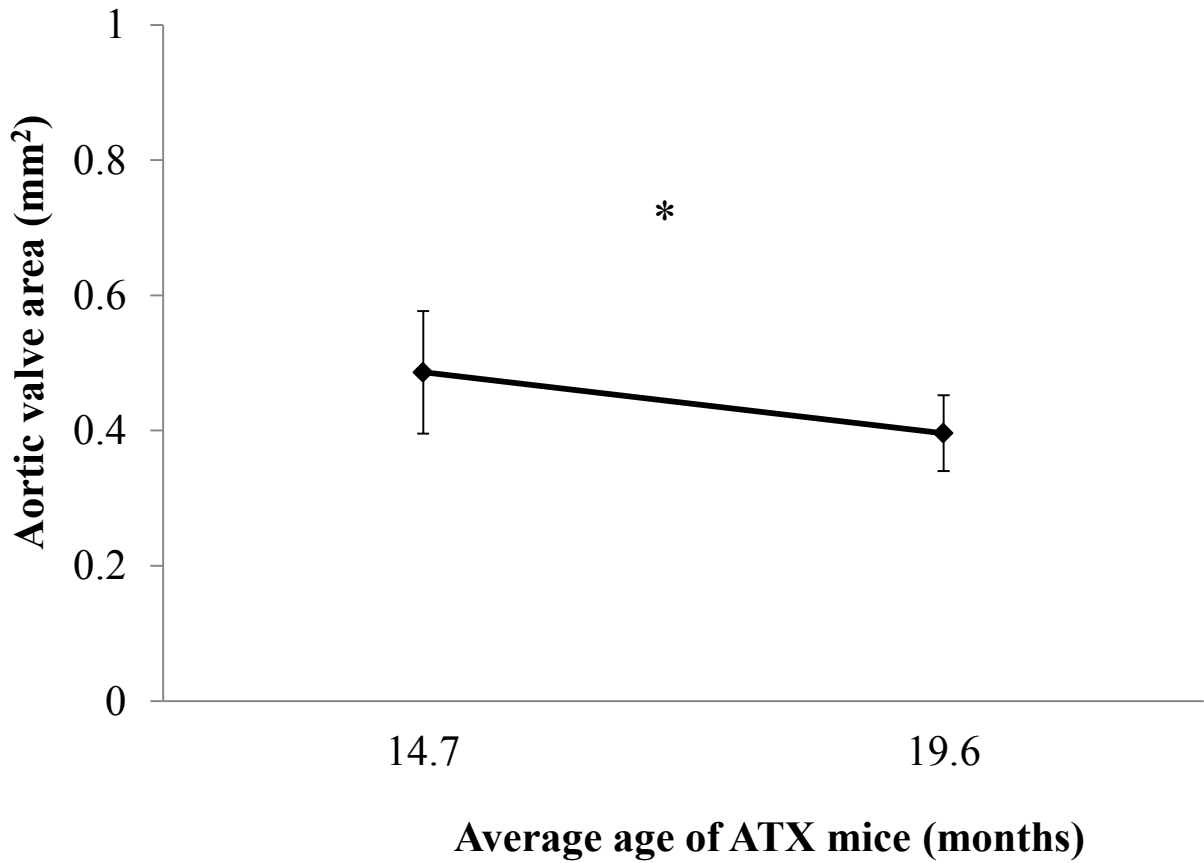


Figure 1. Progression of aortic valve area decrease in the ATX mice (*Ldlr*^{-/-}; *Tg(hApoB*^{+/+}*)*). Echocardiographic measurements of the aortic valve (AVA) obtained from 14.7-month old (n=9) and 19.6 month old (n=9) ATX mice. * $P \leq 0.05$.

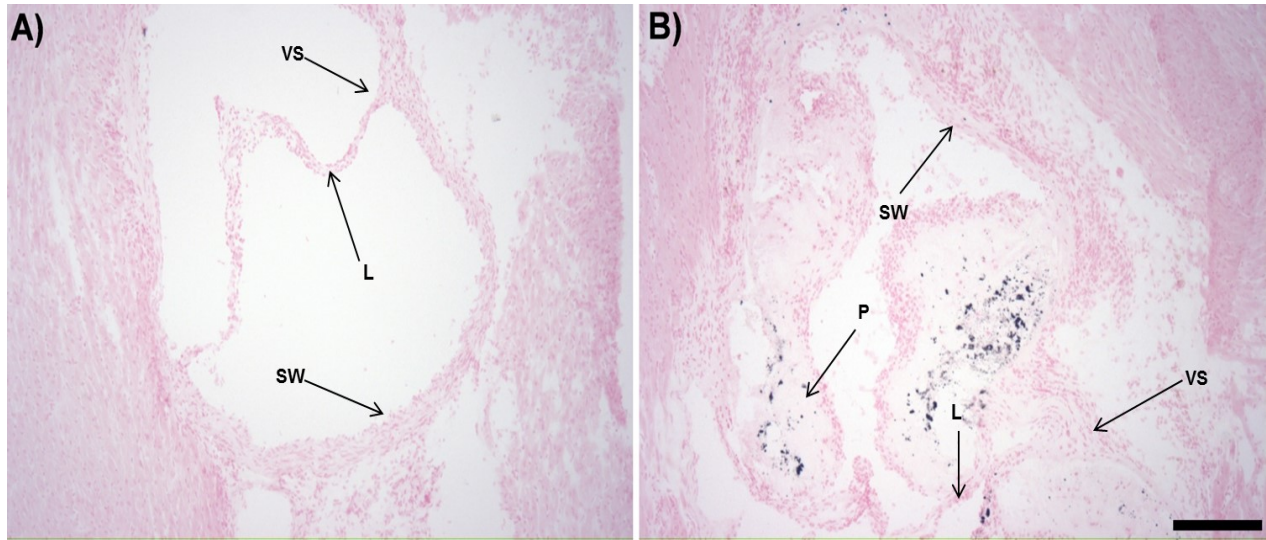
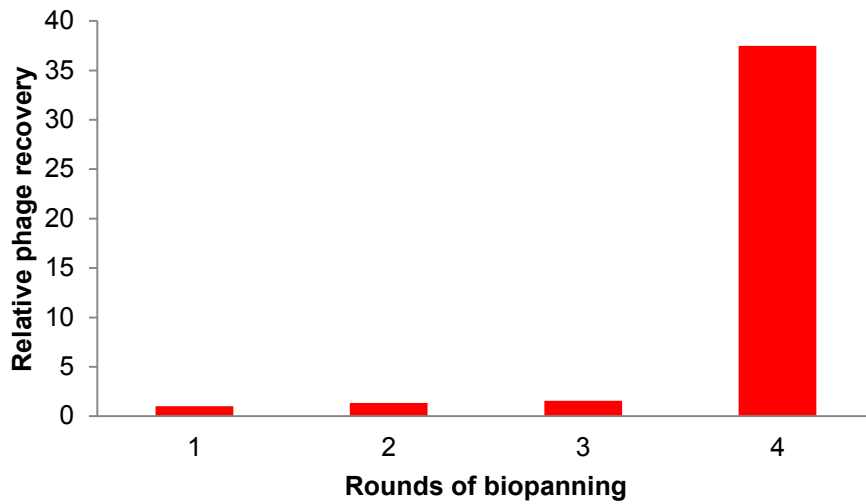


Figure 2. Calcification in the aortic valve tissue of ATX mice. Calcium deposition on the aortic valve tissue appears as black-brown deposition using von Kossa staining. Aortic valve staining using 3 months old wild-type mice tissue (A) and using 19 months old ATX mice tissue (B). Scale bar at B) represent 200 μm . 10x magnification for A) and B). L: Leaflet; VS: Valsalva sinus; P: Plaque SW: Sinus wall.

A) Screening enrichment with Ph.D.-7mer library



B Screening enrichment with Ph.D.-C7C library

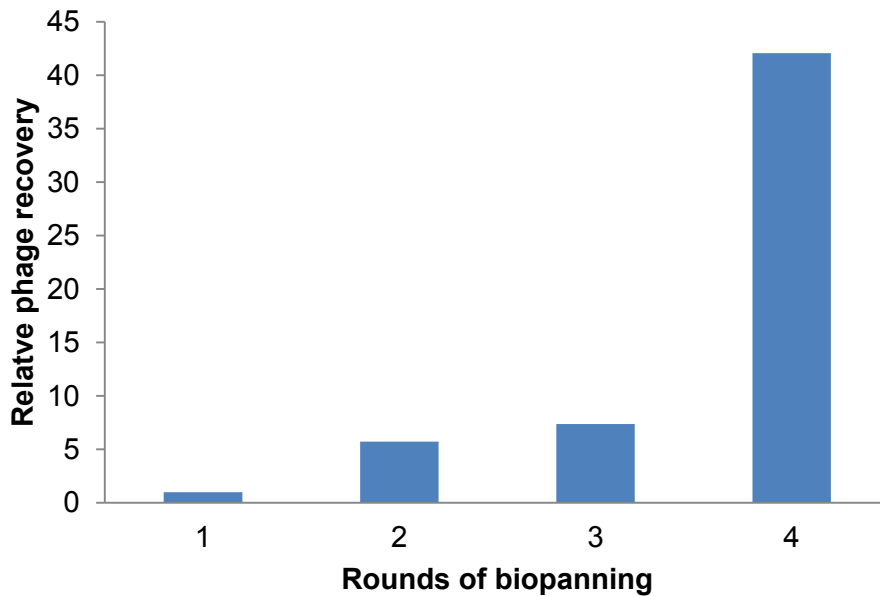


Figure 3. Sequential enrichment of phage homing to the impaired aortic valve in the old ATX mice. Phage recovery was determined as pfu phage per gram of tissues excised in relation to pfu injected. A quantity of 10^{11} pfu of phages from A) the linear 7 amino acids and B) constrained heptapeptide phage library was sequentially panned for the first three rounds. For the 4th round, 10^{10} pfu of the phage library used.

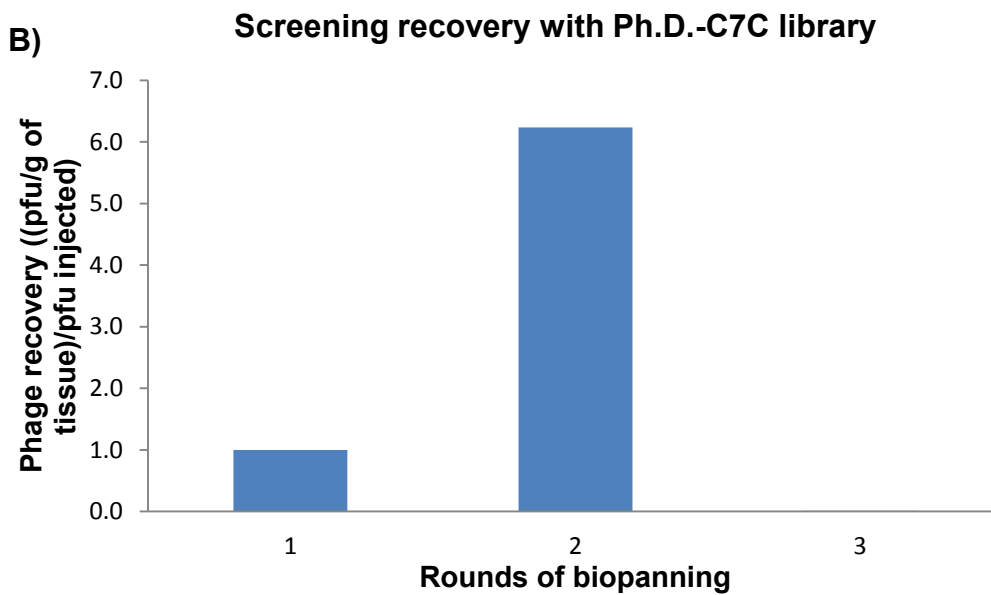
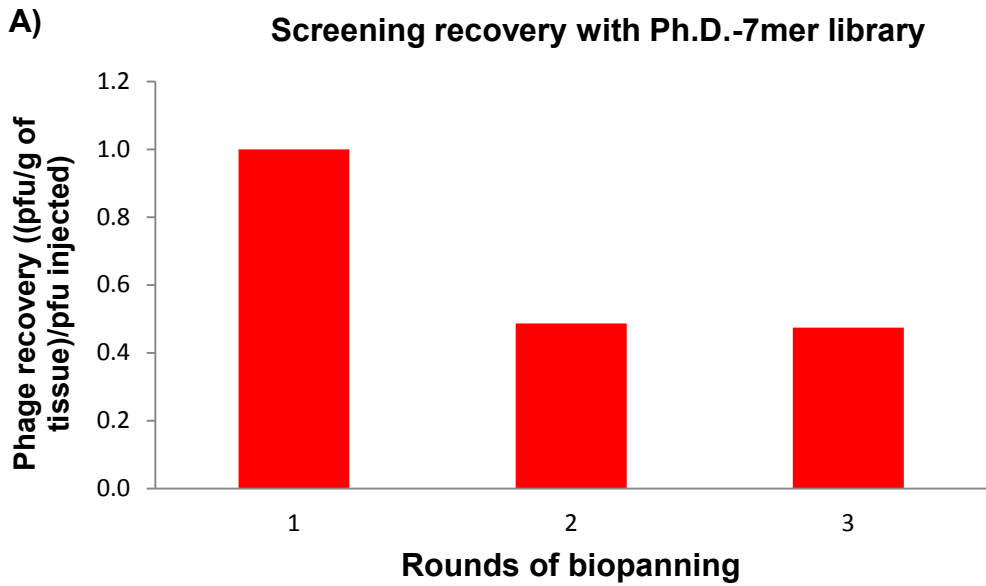


Figure 4. Sequential recovery of phage from the liver in the old ATX mice.

Phage recovery was determined as pfu phage per gram of tissue excised in relation to pfu injected. A quantity of 10^{11} pfu of phages from A) the linear 7 amino acids and B) constrained heptapeptide phage library was sequentially panned for the first three rounds.

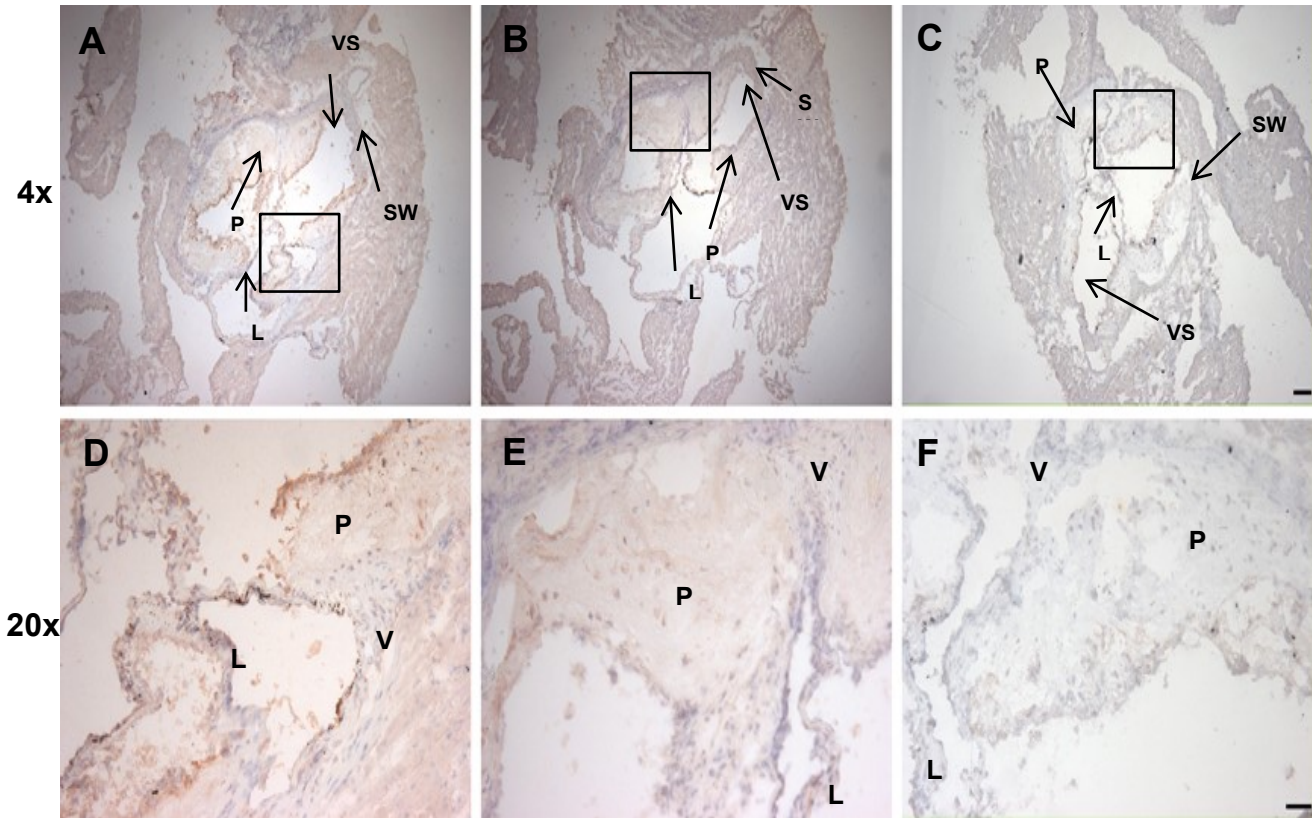


Figure 5. Immunohistochemical staining using phage clones selected from the linear (A, D) and constrained (B, E) library screenings show binding to the aortic valve of ATX mice. 2×10^{11} pfu of phage clones candidates or control insertless phage (C, F) were overlaid on frozen tissues sections of aortic valve from ATX mice and the binding was detected using an anti-M13 phage antibody and peroxidase staining. The phage clone M2.L1 (A, D) from the linear library selection and the constrained candidate M1.C1 (B, E) bind to the aortic valve. C), F) The control insertless phage M13 shows no binding to the aortic valve. Scale bar at C) and F) represent 200 μm and 50 μm , respectively. 4x and 20x magnification for A) to C) and D) to F), respectively. L: Leaflet; VS: Valsalva sinus; P: Plaque SW: Sinus wall.

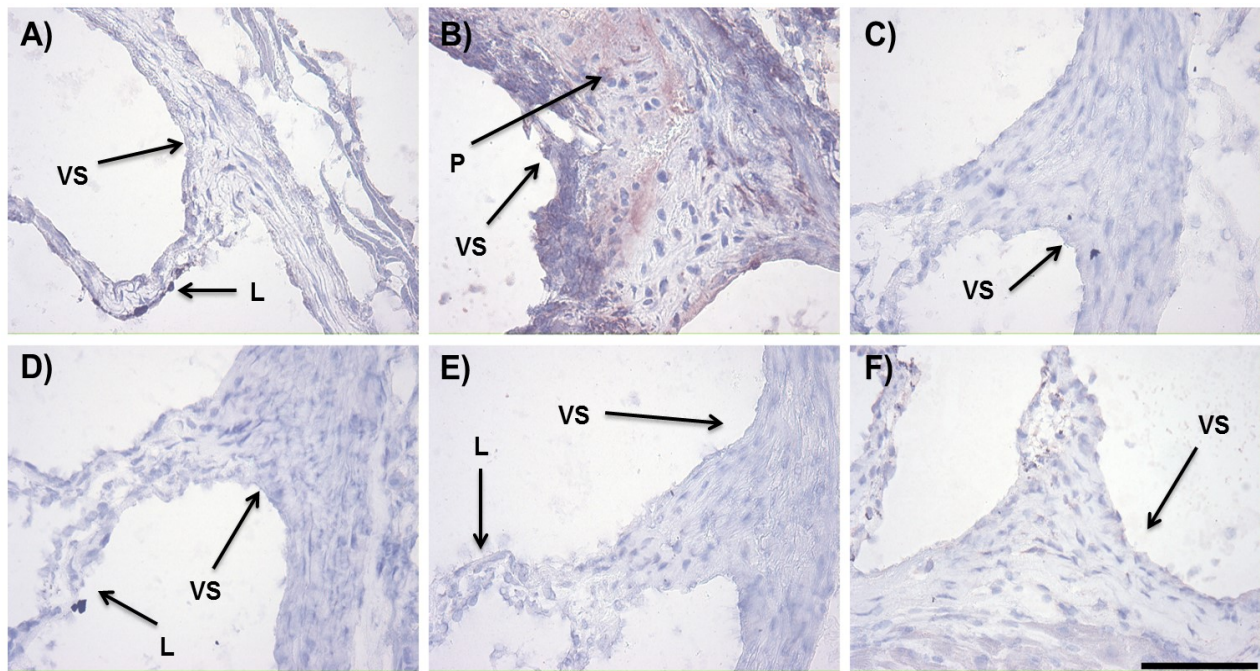


Figure 6. Immunohistochemical staining using 4 phage clones shows no binding to the Valsalva sinus of healthy mice aortic valve tissue. 2×10^{11} pfu of phage clones candidates or control insertless phage (A) were overlaid on frozen tissues sections of normal aortic valve from wild-type mice and the binding was detected using an anti-M13 phage antibody and peroxidase staining. A positive control phage was used on diseased aortic valve tissue of ATX mice as a reference for the peroxidase reaction time. (B) The phage clones M1.C1, M1.C3, M3.C1 and M4.C2 (C-F, respectively) from the constrained library selection show no binding to the healthy aortic valve. Scale bar at F) represent 100 μm . 40x magnification for A) to E). L: Leaflet; P: Plaque; VS: Valsalva sinus.

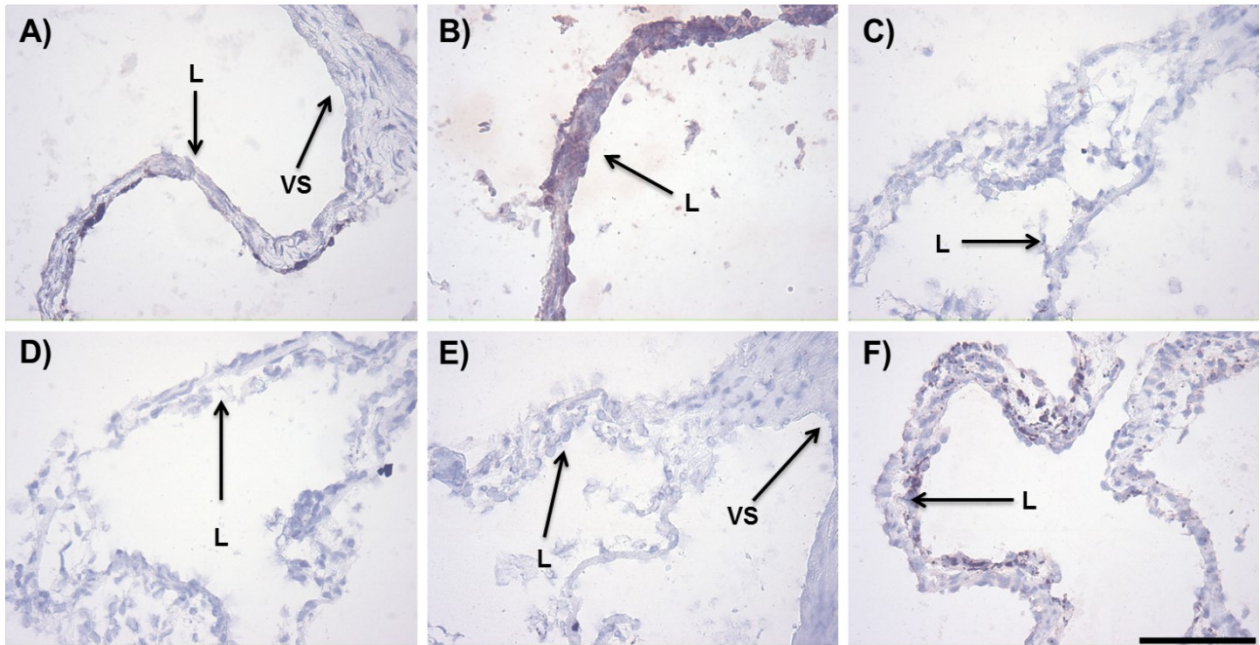


Figure 7. Immunohistochemical staining using 4 phage clones shows no binding to the leaflets of healthy mice aortic valve tissue. 2×10^{11} pfu of phage clones candidates or control insertless phage (A) were overlaid on frozen tissues sections of aortic valve from wild-type mice and the binding was detected using an anti-M13 phage antibody and peroxidase staining. A positive control phage was used on diseased aortic valve tissue of ATX mice as a reference for the peroxidase reaction time. (B) The phage clones M1.C1, M1.C3, M3.C1 and M4.C2 (C-F, respectively) from the constrained library selection show no binding to the healthy aortic valve. Scale bar at F) represent 100 μm . 40x magnification for A) to E). L: Leaflet; VS: Valsalva sinus.

TABLES

Table 1

Peptide sequences identified after an *in vivo* panning in old ATX mice (*Ldlr*^{-/-};Tg(hApoB^{+/+}))

Clone	Sequences of Ph.D.-7	Clone	Sequences of Ph.D.-C7C
M1.L1	TPTSHRR	M1.C1	CIGNSNSSC
M2.L1	KPACHIY	M1.C2	CIGNSNTLC
M2.L2	KPAGDIY	M1.C3	CTGNSNSSC
M2.L3	KPAGHIY	M1.C4	CTGNSNTLC
M2.L4	RPACYIY	M2.C1	CRGAIADec
M2.L5	RPAGHIX	M2.C2	CRGATPMSC
M2.L6	RPARHIY	M3.C1	CSWQIGGNC
M2.L7	TPARHIY	M4.C1	CTVRTCAEC
M3.L1	LSNNNLR	M4.C2	CTVRTSADC
M3.L2	LSSNTLP	M4.C3	CTVRTSAEC
M4.L1	SPSTHWK	M5.C1	CTGNSNALC
M5.L1	TASFAGG		
M5.L2	TASLRGV		
M5.L3	TASYAGG		

Table 2

Immunostaining results for different regions of the aortic valve from 16.2 month old ATX mice using phage clones found from the Ph.D.-7 library screening compared to a control insertless phage.

Clone	Aortic valve	Leaflet	Valsalva Sinus
M1.L1	-	-	-
M2.L1	+	+	+/-plaque
M2.L2	+	+	+/-plaque
M2.L3	+	+	+ plaque
M2.L4	+	+	+/-plaque
M2.L5	+	+	+plaque
M2.L6	+	+	+/-plaque
M2.L7	+ (plaque only)	-	plaque only
M3.L1	-	-	-
M3.L2	-	-	-
M4.L1	-	-	-
M5.L1	+	+	+/-plaque
M5.L2	+	+	+/-plaque
M5.L3	+	+	+/-plaque

+: Staining

-: No staining

plaque: Staining on Valsalva sinus plaque

Table 3

Immunostaining results for different regions of the aortic valve from 16.2 month old ATX mice using phage clones found from the Ph.D-C7C library screening compared to a control insertless phage.

Clone	Aortic valve	Leaflet	Valsalva Sinus
M1.C1	+	+	+/plaque
M1.C2	+	+	+/plaque
M1.C3	+	+	+/plaque
M1.C4	+	+	+/plaque
M2.C1	+	+	+/plaque
M2.C2	+	+	+/plaque
M3.C1	+	+	+/plaque
M4.C1	+	+	+/plaque
M4.C2	+	+	+/plaque
M4.C3	+	+	+/plaque
M5.C1	+	+	+/plaque

+: Staining

-: No staining

plaque: Staining on Valsalva sinus plaque

Table 4

Immunostaining results for different control tissues from 16.2 month old ATX mice using phages found from the linear and constrained phage library screenings compared to control insertless phage staining.

Sequences	Lungs	Liver	Kidney	Spleen	Ventricle
M2.L1	-	-	-	-	+
M2.L2	+	-	-	-	+
M2.L3	+	-	-	-	-
M5.L2	+	-	-	-	-
M1.C1	-	-	-	-	-
M1.C3	-	-	-	-	-
M2.C1	-	-	-	-	+
M3.C1	-	-	-	-	-
M4.C2	-	-	-	-	-

+: Staining

-: No staining

Supplementary data

Table I

Examples of mouse proteins with homology motifs to peptide sequences from phages recovered after screening from aortic valve tissues using a constrained 7 amino acid library in an aortic valvular stenosis mouse model.

Clone	Peptide sequence	Example of protein with homology motif	Matching motif	Accession ID
M1.C1	CIGNSNSSC	prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	CIGNS-S-C	NP_032538.2
		mastermind-like protein 1 (Mam1)	SNSSC	NP_780543.2
		forkhead box protein C1 (Foxc1)	N-NSSC	NP_032618.2
M1.C3	CTGNSNSSC	tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A precursor	TGNSNS	NP_033425.3
		disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 isoform 4	CTGNS-S-C	NP_001278800.1
		mastermind-like protein 1	SNSSC	NP_780543.2
		forkhead box protein C1	N-NSSC	NP_032618.2
M3.C1	CSWQIGGNC	Krüppel-like factor 13, A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 8 precursor, A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 precursor	CSWQ	NP_067341.2, NP_038934.2, NP_033751.3
M4.C2	CTVRTSADC	a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 3 isoform 2 precursor	VRTSAD	NP_001074870.1
		toll-like receptor 3 precursor	CTVR---ADC	NP_569054.2

Peptides were analyzed using a protein-protein BLAST search using reference proteins as database.

3. Discussion

Dans ce projet, nous avons démontré l'application d'une sélection *in vivo* du modèle de la sténose valvulaire aortique chez la souris par *phage display* pour la découverte de peptides qui ciblent la valve aortique. Les différents modèles de la sténose valvulaire aortique chez la souris sont avantageux à la compréhension de la pathogénèse, cependant ils possèdent d'importantes limites pour la reproduction des symptômes cliniques de la maladie.(280) Premièrement, la structure de la valve aortique murine ne possède pas trois couches définies de tissus internes de la valve aortique comme celles présentes chez l'homme. Les feuillets de la valve de la souris sont plutôt composés d'une épaisseur d'environ 5 à 10 cellules et ne possèdent pas de couches distinctes.(281) Un deuxième désavantage du modèle de souris est que la souris de type sauvage soumise à une diète normale ne présente pas de calcification spontanée.(282) L'étude de la SVAc nécessite une diète spéciale enrichie de cholestérol et de carbohydrates afin de stimuler la calcification et l'athérogenèse chez la souris.(88) Les modèles transgéniques de SVA comme les souris ATX que nous avons utilisé sont une autre stratégie pour imiter des syndromes cliniques de la SVAc.(81, 83, 88, 90) D'autres études utilisent des interventions invasives comme la néphrotomie pour induire la calcification au niveau de la valve aortique.(41, 283, 284)

La possibilité de pouvoir expérimenter sur différents modèles animaux de la SVA est néanmoins utile pour la compréhension des différents aspects et mécanismes de la pathophysiologie de la maladie. Le modèle de la sténose valvulaire aortique calcifiée chez le lapin avec une diète hyperlipidémique supplémentée avec de la vitamine D a déjà été étudié dans le laboratoire.(80) Un avantage de ce choix d'animal est que la valve du lapin est composée de 3 couches distinctes de tissus, cette morphologie des valves permet de reproduire les conditions de la SVA présents chez l'homme.(280), ce qui est utile pour l'étude des effets des différentes molécules présentes sur l'endothélium valvulaire à différentes étapes de la pathogénèse. Le modèle de lapin est utile aussi pour la compréhension de la SVA étant donné qu'il répond aux diètes contenant du cholestérol et possède un métabolisme du cholestérol semblable à l'homme.(280) Un désavantage du modèle d'hyperlipidémie chez le lapin est l'utilisation d'une diète très élevée en cholestérol supplémentée avec de la vitamine D₂, une

combinaison qui n'est pas rencontré chez l'homme pour induire le développement de la maladie.(280)

Les peptides obtenus ciblant la valve aortique dont l'identité de la cible est encore inconnue peuvent être exploités dans des applications pratiques au niveau de l'imagerie et de la thérapie. Il serait intéressant de trouver l'identité des protéines liant chacun des peptides candidats afin de déterminer s'ils ne ciblent pas une nouvelle cible qui jouerait un rôle dans la pathogénèse de la SVA. L'analyse par immunohistochimie indique que les trois clones de phages M2.L1, M2.L2 et M2.C1 ciblent la valve aortique mais peuvent aussi se lier au ventricule. Ces trois candidats pourraient cibler des molécules qui sont reliés à l'activité fibrotique observée dans la SVA et le processus d'hypertrophie du ventricule gauche. Ces molécules seraient présentes à la surface du ventricule gauche hypertrophié et accessibles dans la valve aortique malade. Parmi les cibles communes possibles dans la fibrose de la valve et dans l'hypertrophie du ventricule, on peut penser à des cibles qui pourraient être liées à des protéines modulées par le système rénine-angiotensine-aldostérone lesquelles peuvent avoir un rôle à la fois dans la SVA et l'hypertrophie ventriculaire. En effet, un traitement aux inhibiteurs de l'ECA dans un modèle d'hypertrophie ventriculaire gauche chez le rat par une constriction aortique a un effet bénéfique sur la survie et la régression de l'hypertrophie des myocytes. (146) Des observations du myocarde chez ce modèle de rat avec une surcharge de la pression ventriculaire démontrent aussi des régions de fibroses qui sont colocalisées avec les sites d'apoptoses des myocytes.(285, 286) L'apoptose de cellules musculaires ou de macrophages calcifiés semble jouer aussi un rôle dans les microcalcifications des valves humaines calcifiées.(287) Un autre article indique que TGF- β 1 cause la calcification des VICs par en association avec l'apoptose.(24) (146) Ceci indique que les protéines impliqués dans l'instabilité de la matrice extracellulaire durant la fibrose tel que TGF- β , le collagène, l'élastine, les MMPs et les TIMPS peuvent donc être des cibles potentiels des peptides exprimés à la surface des clones de phages.(9)

Les résultats des analyses BLASTs indiquent que certains des peptides des clones de phages partagent une homologie avec des protéines intracellulaires comme Maml1 et Kfl13. Il est possible que des lésions endothéliales présentes dans la valve aortique malade soient assez importantes pour permettre aux phages d'atteindre des sites de lésions tissulaires et d'apoptose

où le contenu intracellulaire pourrait devenir accessible aux phages. Une autre explication possible est que la protéine normalement intracellulaire est parvenue à la surface de certaines cellules dans le tissu malade et non dans le tissu normal. Cela a été observé dans un screening sur des cellules cancéreuses.(288)

Des expériences additionnelles pour les peptides découverts dans le modèle de souris sont requises afin de pouvoir valider leur spécificité à cibler la valve aortique avant de pouvoir les valider dans un animal vivant. La caractérisation de ces peptides synthétisés avec un marqueur fluorescent ou un marqueur radioactif dans des tests de spécificité *in vivo* permettrait d'évaluer leur potentiel comme agents d'imagerie moléculaire pour la visualisation de la SVA ou comme agent thérapeutique permettant de cibler la valve aortique. L'identité de la cible de ces phages spécifiques pourrait être déterminée par des expériences de chromatographie avec les peptides synthétisés ou d'immunoprécipitations en combinaison avec la spectrométrie de masse.(233) Une validation de leur potentiel comme agent d'imagerie moléculaire dans le modèle expérimental murine de la SVA est nécessaire avant de procéder à des futures applications. En effet, la synthèse du peptide conjugué avec une molécule fluorescente pourrait modifier sa capacité de liaison avec la cible et lui faire perdre ses propriétés biologiques. Le classement du potentiel d'affinité des peptides selon le degré de sévérité de la sténose valvulaire aortique serait intéressant pour le diagnostic de la SVA.

À notre connaissance, c'est la première fois qu'il y a la mention de la découverte par *phage display* de peptides qui ciblent une valve aortique atteinte de la SVA chez la souris. Les résultats de la sélection présentée dans ce mémoire permettraient d'envisager l'application future de ces nouveaux peptides spécifiques à la valve aortique comme transporteurs de l'apoA-I mimétique pour essayer d'améliorer l'efficacité d'un nouveau traitement de la SVA. La conjugaison ou la fusion de l'apoA-I mimétique avec un de ces peptides pourrait permettre d'augmenter son efficacité thérapeutique dans la valve aortique et de diminuer la quantité de peptide nécessaire au traitement. En donnant au peptide mimétique apoA-I la capacité de cibler spécifiquement la valve aortique, il y aurait moins de pertes dans la circulation systémique et une meilleure accumulation du médicament à la cible. De plus, en diminuant la quantité de peptide mimétique nécessaire, on pourrait réduire les effets délétères se produisant par l'arrivée au niveau du foie, d'une grande quantité de cholestérol. La possibilité de pouvoir

classer les peptides selon le degré de sévérité de la SVA qu'ils ciblent augmenterait le potentiel thérapeutique de la drogue en ciblant un marqueur présent en plus grande quantité dans le degré de pathologie ciblée.

Bibliographie

1. Freeman RV, and Otto CM. Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation*. 2005;111(24):3316-26.
2. Alexopoulos A, Kaoukis A, Papadaki H, and Pyrgakis V. Pathophysiologic mechanisms of calcific aortic stenosis. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*. 2012;6(2):71-80.
3. Arsenault BJ, Boekholdt SM, Dube MP, Rheume E, Wareham NJ, Khaw KT, Sandhu MS, and Tardif JC. Lipoprotein(a) Levels, Genotype and Incident Aortic Valve Stenosis: A Prospective Mendelian Randomization Study and Replication in a Case-Control Cohort. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2014.
4. Carabello BA. Clinical practice. Aortic stenosis. *The New England journal of medicine*. 2002;346(9):677-82.
5. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, Iung B, Otto CM, Pellikka PA, Quinones M, et al. Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*. 2009;22(1):1-23; quiz 101-2.
6. Maganti K, Rigolin VH, Sarano ME, and Bonow RO. Valvular heart disease: diagnosis and management. *Mayo Clinic proceedings*. 2010;85(5):483-500.
7. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Barwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde JL, Vermeer F, Boersma E, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *European heart journal*. 2003;24(13):1231-43.
8. Iung B, and Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nature reviews Cardiology*. 2011;8(3):162-72.
9. Dweck MR, Boon NA, and Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(19):1854-63.
10. Iung B, and Vahanian A. Degenerative calcific aortic stenosis: a natural history. *Heart*. 2012;98 Suppl 4(iv7-13).
11. Li C, Xu S, and Gotlieb AI. The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2012;22(1):1-8.
12. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, and Otto CM. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997;29(3):630-4.
13. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, Kerr KF, Pechlivanis S, Budoff MJ, Harris TB, et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *The New England journal of medicine*. 2013;368(6):503-12.

14. Yetkin E, and Waltenberger J. Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *International journal of cardiology*. 2009;135(1):4-13.
15. Leopold JA. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Circulation Cardiovascular interventions*. 2012;5(4):605-14.
16. Kochtebane N, Choqueux C, Michel JB, and Jacob MP. [Aortic stenosis and extracellular matrix remodeling]. *Biologie aujourd'hui*. 2012;206(2):135-43.
17. Liu AC, Joag VR, and Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *The American journal of pathology*. 2007;171(5):1407-18.
18. Gould ST, Srigunapalan S, Simmons CA, and Anseth KS. Hemodynamic and cellular response feedback in calcific aortic valve disease. *Circulation research*. 2013;113(2):186-97.
19. Mathieu P, and Boulanger MC. Basic mechanisms of calcific aortic valve disease. *The Canadian journal of cardiology*. 2014;30(9):982-93.
20. Mahler GJ, and Butcher JT. Inflammatory regulation of valvular remodeling: the good(?), the bad, and the ugly. *International journal of inflammation*. 2011;2011(721419).
21. Cote C, Pibarot P, Despres JP, Mohty D, Cartier A, Arsenault BJ, Couture C, and Mathieu P. Association between circulating oxidised low-density lipoprotein and fibrocalcific remodelling of the aortic valve in aortic stenosis. *Heart*. 2008;94(9):1175-80.
22. New SE, and Aikawa E. Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification. *Circulation research*. 2011;108(11):1381-91.
23. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, and O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*. 1994;90(2):844-53.
24. Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER, 3rd, and Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *The Annals of thoracic surgery*. 2003;75(2):457-65; discussion 65-6.
25. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kilic R, Sarikoc A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase KK, et al. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*. 2003;170(2):205-11.
26. Nadlonek N, Lee JH, Reece TB, Weyant MJ, Cleveland JC, Jr., Meng X, and Fullerton DA. Interleukin-1 Beta induces an inflammatory phenotype in human aortic valve interstitial cells through nuclear factor kappa Beta. *The Annals of thoracic surgery*. 2013;96(1):155-62.
27. Helske S, Lindstedt KA, Laine M, Mayranpaa M, Werkkala K, Lommi J, Turto H, Kupari M, and Kovanen PT. Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(9):1859-66.
28. Lee JH, Meng X, Weyant MJ, Reece TB, Cleveland JC, Jr., and Fullerton DA. Stenotic aortic valves have dysfunctional mechanisms of anti-inflammation: implications for

- aortic stenosis. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2011;141(2):481-6.
29. Helske S, Syvaranta S, Kupari M, Lappalainen J, Laine M, Lommi J, Turto H, Mayranpaa M, Werkkala K, Kovanen PT, et al. Possible role for mast cell-derived cathepsin G in the adverse remodelling of stenotic aortic valves. *European heart journal*. 2006;27(12):1495-504.
 30. Wypasek E, Natorska J, Grudzien G, Filip G, Sadowski J, and Undas A. Mast cells in human stenotic aortic valves are associated with the severity of stenosis. *Inflammation*. 2013;36(2):449-56.
 31. Bach DS. Echo/Doppler evaluation of hemodynamics after aortic valve replacement: principles of interrogation and evaluation of high gradients. *JACC Cardiovascular imaging*. 2010;3(3):296-304.
 32. Akahori H, Tsujino T, Naito Y, Matsumoto M, Lee-Kawabata M, Ohyanagi M, Mitsuno M, Miyamoto Y, Daimon T, Hao H, et al. Intraleaflet haemorrhage is associated with rapid progression of degenerative aortic valve stenosis. *European heart journal*. 2011;32(7):888-96.
 33. Syvaranta S, Helske S, Laine M, Lappalainen J, Kupari M, Mayranpaa MI, Lindstedt KA, and Kovanen PT. Vascular endothelial growth factor-secreting mast cells and myofibroblasts: a novel self-perpetuating angiogenic pathway in aortic valve stenosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(6):1220-7.
 34. Collett GD, and Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circulation research*. 2005;96(9):930-8.
 35. Fondard O, Detaint D, Iung B, Choqueux C, Adle-Biassette H, Jarraya M, Hvas U, Couetil JP, Henin D, Michel JB, et al. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *European heart journal*. 2005;26(13):1333-41.
 36. Pacifici R, Carano A, Santoro SA, Rifas L, Jeffrey JJ, Malone JD, McCracken R, and Avioli LV. Bone matrix constituents stimulate interleukin-1 release from human blood mononuclear cells. *The Journal of clinical investigation*. 1991;87(1):221-8.
 37. Miller JD, Weiss RM, and Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis: methods, models, and mechanisms. *Circulation research*. 2011;108(11):1392-412.
 38. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kilic R, Sarikoc A, Pinol R, Hagl S, Lang S, et al. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol*. 2005;14(2):80-7.
 39. Perrotta I, Russo E, Camastra C, Filice G, Di Mizio G, Colosimo F, Ricci P, Tripepi S, Amorosi A, Triumbari F, et al. New evidence for a critical role of elastin in calcification of native heart valves: immunohistochemical and ultrastructural study with literature review. *Histopathology*. 2011;59(3):504-13.
 40. Helske S, Syvaranta S, Lindstedt KA, Lappalainen J, Oorni K, Mayranpaa MI, Lommi J, Turto H, Werkkala K, Kupari M, et al. Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(8):1791-8.
 41. Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo JL, Rusanescu G, Iwamoto Y, Fukuda D, Kohler RH, Shi GP, Jaffer FA, et al. Arterial and aortic valve calcification abolished

- by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation*. 2009;119(13):1785-94.
42. Simionescu A, Simionescu DT, and Vyavahare NR. Osteogenic responses in fibroblasts activated by elastin degradation products and transforming growth factor-beta1: role of myofibroblasts in vascular calcification. *The American journal of pathology*. 2007;171(1):116-23.
 43. Chen JH, and Simmons CA. Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues. *Circulation research*. 2011;108(12):1510-24.
 44. Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Castaneda LE, Brooks RM, Zimmerman K, and Heistad DD. Evidence for active regulation of pro-osteogenic signaling in advanced aortic valve disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(12):2482-6.
 45. Mohler ER, 3rd. Mechanisms of aortic valve calcification. *The American journal of cardiology*. 2004;94(11):1396-402, A6.
 46. Jian B, Jones PL, Li Q, Mohler ER, 3rd, Schoen FJ, and Levy RJ. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *The American journal of pathology*. 2001;159(1):321-7.
 47. O'Brien KD, Shavelle DM, Caulfield MT, McDonald TO, Olin-Lewis K, Otto CM, and Probstfield JL. Association of angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma. *Circulation*. 2002;106(17):2224-30.
 48. Satta J, Melkko J, Pollanen R, Tuukkanen J, Paakko P, Ohtonen P, Mennander A, and Soini Y. Progression of human aortic valve stenosis is associated with tenascin-C expression. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;39(1):96-101.
 49. Gossel M, Khosla S, Zhang X, Higano N, Jordan KL, Loeffler D, Enriquez-Sarano M, Lennon RJ, McGregor U, Lerman LO, et al. Role of circulating osteogenic progenitor cells in calcific aortic stenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(19):1945-53.
 50. Shetty R, Pepin A, Charest A, Perron J, Doyle D, Voisine P, Dagenais F, Pibarot P, and Mathieu P. Expression of bone-regulatory proteins in human valve allografts. *Heart*. 2006;92(9):1303-8.
 51. Mohler ER, 3rd, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, and Gannon FH. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *The Journal of heart valve disease*. 1999;8(3):254-60.
 52. Virmani R, Joner M, and Sakakura K. Recent highlights of ATVB: calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(7):1329-32.
 53. Ix JH, Chertow GM, Shlipak MG, Brandenburg VM, Ketteler M, and Whooley MA. Association of fetuin-A with mitral annular calcification and aortic stenosis among persons with coronary heart disease: data from the Heart and Soul Study. *Circulation*. 2007;115(19):2533-9.
 54. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, and Srivastava D. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005;437(7056):270-4.

55. Zeng Q, Song R, Ao L, Weyant MJ, Lee J, Xu D, Fullerton DA, and Meng X. Notch1 promotes the pro-osteogenic response of human aortic valve interstitial cells via modulation of ERK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(7):1580-90.
56. Acharya A, Hans CP, Koenig SN, Nichols HA, Galindo CL, Garner HR, Merrill WH, Hinton RB, and Garg V. Inhibitory role of Notch1 in calcific aortic valve disease. *PLoS one*. 2011;6(11):e27743.
57. Bai S, Kopan R, Zou W, Hilton MJ, Ong CT, Long F, Ross FP, and Teitelbaum SL. NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(10):6509-18.
58. O'Brien KD. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(8):1721-8.
59. Towler DA. Molecular and cellular aspects of calcific aortic valve disease. *Circulation research*. 2013;113(2):198-208.
60. Miller JD, Chu Y, Brooks RM, Richenbacher WE, Pena-Silva R, and Heistad DD. Dysregulation of antioxidant mechanisms contributes to increased oxidative stress in calcific aortic valvular stenosis in humans. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52(10):843-50.
61. Liberman M, Bassi E, Martinatti MK, Lario FC, Wosniak J, Jr., Pomerantzeff PM, and Laurindo FR. Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(3):463-70.
62. Branchetti E, Sainger R, Poggio P, Grau JB, Patterson-Fortin J, Bavaria JE, Chorny M, Lai E, Gorman RC, Levy RJ, et al. Antioxidant enzymes reduce DNA damage and early activation of valvular interstitial cells in aortic valve sclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(2):e66-74.
63. Wada T, McKee MD, Steitz S, and Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circulation research*. 1999;84(2):166-78.
64. Yan J, Stringer SE, Hamilton A, Charlton-Menys V, Gotting C, Muller B, Aeschlimann D, and Alexander MY. Decorin GAG synthesis and TGF-beta signaling mediate Ox-LDL-induced mineralization of human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(3):608-15.
65. Taylor J, Butcher M, Zeadin M, Politano A, and Shaughnessy SG. Oxidized low-density lipoprotein promotes osteoblast differentiation in primary cultures of vascular smooth muscle cells by up-regulating Osterix expression in an Msx2-dependent manner. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(2):581-8.
66. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature immunology*. 2010;11(2):155-61.

67. Marinou K, Christodoulides C, Antoniadou C, and Koutsilieris M. Wnt signaling in cardiovascular physiology. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2012;23(12):628-36.
68. Cioffi G, Faggiano P, Vizzardi E, Tarantini L, Cramariuc D, Gerds E, and de Simone G. Prognostic effect of inappropriately high left ventricular mass in asymptomatic severe aortic stenosis. *Heart*. 2011;97(4):301-7.
69. Kupari M, Turto H, and Lommi J. Left ventricular hypertrophy in aortic valve stenosis: preventive or promotive of systolic dysfunction and heart failure? *European heart journal*. 2005;26(17):1790-6.
70. Lavie CJ, Milani RV, Patel D, Artham SM, and Ventura HO. Disparate effects of obesity and left ventricular geometry on mortality in 8088 elderly patients with preserved systolic function. *Postgraduate medicine*. 2009;121(3):119-25.
71. Orłowska-Baranowska E, Placha G, Gaciong Z, Baranowski R, Zakrzewski D, Michalek P, Hoffman P, and Rawczynska-Englert I. Influence of ACE I/D genotypes on left ventricular hypertrophy in aortic stenosis: gender-related differences. *The Journal of heart valve disease*. 2004;13(4):574-81.
72. Rieck AE, Cramariuc D, Staal EM, Rossebo AB, Wachtell K, and Gerds E. Impact of hypertension on left ventricular structure in patients with asymptomatic aortic valve stenosis (a SEAS substudy). *Journal of hypertension*. 2010;28(2):377-83.
73. Briand M, Dumesnil JG, Kadem L, Tongue AG, Rieu R, Garcia D, and Pibarot P. Reduced systemic arterial compliance impacts significantly on left ventricular afterload and function in aortic stenosis: implications for diagnosis and treatment. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(2):291-8.
74. Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, Bauer EP, Klovekorn WP, and Schaper J. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation*. 2003;107(7):984-91.
75. Weber KT. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *Journal of hypertension*. 2004;22(1):47-50.
76. Nazarian S. Is ventricular arrhythmia a possible mediator of the association between aortic stenosis-related midwall fibrosis and mortality? *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;58(12):1280-2.
77. Rajamannan NM, Subramaniam M, Caira F, Stock SR, and Spelsberg TC. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced calcification in the aortic valves via the Lrp5 receptor pathway. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I229-34.
78. Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M, Sebo TC, Niekrasz M, McConnell JP, Singh RJ, Stone NJ, Bonow RO, and Spelsberg TC. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve. *Circulation*. 2002;105(22):2660-5.
79. Rajamannan NM, Subramaniam M, Stock SR, Stone NJ, Springett M, Ignatiev KI, McConnell JP, Singh RJ, Bonow RO, and Spelsberg TC. Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve. *Heart*. 2005;91(6):806-10.

80. Busseuil D, Shi Y, Mecteau M, Brand G, Kernaleguen AE, Thorin E, Latour JG, Rheume E, and Tardif JC. Regression of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic peptide infusions in rabbits. *British journal of pharmacology*. 2008;154(4):765-73.
81. Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, Young SG, and Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2006;114(19):2065-9.
82. Tanaka K, Sata M, Fukuda D, Suematsu Y, Motomura N, Takamoto S, Hirata Y, and Nagai R. Age-associated aortic stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(1):134-41.
83. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, Jaffer FA, Aikawa M, and Weissleder R. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation*. 2007;116(24):2841-50.
84. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, Simmons CA, Masters KS, Mathieu P, O'Brien KD, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*. 2011;124(16):1783-91.
85. Getz GS, and Reardon CA. Diet and murine atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(2):242-9.
86. Miller JD, Weiss RM, Serrano KM, Brooks RM, 2nd, Berry CJ, Zimmerman K, Young SG, and Heistad DD. Lowering plasma cholesterol levels halts progression of aortic valve disease in mice. *Circulation*. 2009;119(20):2693-701.
87. Lieu HD, Withycombe SK, Walker Q, Rong JX, Walzem RL, Wong JS, Hamilton RL, Fisher EA, and Young SG. Eliminating atherogenesis in mice by switching off hepatic lipoprotein secretion. *Circulation*. 2003;107(9):1315-21.
88. Drolet MC, Roussel E, Deshaies Y, Couet J, and Arsenault M. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(4):850-5.
89. Valenta DT, Bulgrien JJ, Banka CL, and Curtiss LK. Overexpression of human ApoAI transgene provides long-term atheroprotection in LDL receptor-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2006;189(2):255-63.
90. Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, Lok VM, Jaffer FA, Aikawa M, and Weissleder R. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease. *Circulation*. 2007;115(3):377-86.
91. Pereira TM, Nogueira BV, Lima LC, Porto ML, Arruda JA, Vasquez EC, and Meyrelles SS. Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. *Lipids in health and disease*. 2010;9(87).
92. Canault M, Peiretti F, Poggi M, Mueller C, Kopp F, Bonardo B, Bastelica D, Nicolay A, Alessi MC, and Nalbhone G. Progression of atherosclerosis in ApoE-deficient mice that express distinct molecular forms of TNF-alpha. *The Journal of pathology*. 2008;214(5):574-83.
93. Sheehan AL, Carrell S, Johnson B, Stanic B, Banfi B, and Miller FJ, Jr. Role for Nox1 NADPH oxidase in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2011;216(2):321-6.

94. Van De Parre TJ, Guns PJ, Fransen P, Martinet W, Bult H, Herman AG, and De Meyer GR. Attenuated atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice lacking amyloid precursor protein. *Atherosclerosis*. 2011;216(1):54-8.
95. Roosens B, Bala G, Droogmans S, Van Camp G, Breyne J, and Cosyns B. Animal models of organic heart valve disease. *International journal of cardiology*. 2013;165(3):398-409.
96. Monetti M, Canavesi M, Camera M, Parente R, Paoletti R, Tremoli E, Corsini A, and Bellosta S. Rosuvastatin displays anti-atherothrombotic and anti-inflammatory properties in apoE-deficient mice. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2007;55(5):441-9.
97. Choi SE, Jang HJ, Kang Y, Jung JG, Han SJ, Kim HJ, Kim DJ, and Lee KW. Atherosclerosis induced by a high-fat diet is alleviated by lithium chloride via reduction of VCAM expression in ApoE-deficient mice. *Vascular pharmacology*. 2010;53(5-6):264-72.
98. Trapeaux J, Busseuil D, Shi Y, Nobari S, Shustik D, Mecteau M, El-Hamamsy I, Lebel M, Mongrain R, Rheume E, et al. Improvement of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic therapy is associated with decreased aortic root and valve remodelling in mice. *British journal of pharmacology*. 2013;169(7):1587-99.
99. Drolet MC, Arsenault M, and Couet J. Experimental aortic valve stenosis in rabbits. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41(7):1211-7.
100. Holzgreve H, and Burkle B. Anti-atherosclerotic effects of calcium antagonists. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. 1993;11(1):S55-9.
101. Toda T, Toda Y, and Kummerow FA. Coronary arterial lesions in piglets from sows fed moderate excesses of vitamin D. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 1985;145(3):303-10.
102. Toda T, Ito M, Toda Y, Smith T, and Kummerow F. Angiotoxicity in swine of a moderate excess of dietary vitamin D3. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1985;23(6):585-92.
103. Toda T, Leszczynski DE, and Kummerow FA. The role of 25-hydroxy-vitamin D3 in the induction of atherosclerosis in swine and rabbit by hypervitaminosis D. *Acta pathologica japonica*. 1983;33(1):37-44.
104. Rozeik M, Wheatley D, and Gourlay T. The aortic valve: structure, complications and implications for transcatheter aortic valve replacement. *Perfusion*. 2014;29(4):285-300.
105. Lindman BR, Bonow RO, and Otto CM. Current management of calcific aortic stenosis. *Circulation research*. 2013;113(2):223-37.
106. Lee R, Li S, Rankin JS, O'Brien SM, Gammie JS, Peterson ED, McCarthy PM, Edwards FH, and Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac Surgical D. Fifteen-year outcome trends for valve surgery in North America. *The Annals of thoracic surgery*. 2011;91(3):677-84; discussion p 84.
107. Brown JM, O'Brien SM, Wu C, Sikora JA, Griffith BP, and Gammie JS. Isolated aortic valve replacement in North America comprising 108,687 patients in 10 years: changes in risks, valve types, and outcomes in the Society of Thoracic Surgeons National Database. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2009;137(1):82-90.

108. Thaden JJ, Nkomo VT, and Enriquez-Sarano M. The global burden of aortic stenosis. *Progress in cardiovascular diseases*. 2014;56(6):565-71.
109. Vaishnava P, Fuster V, Goldman M, and Bonow RO. Surgery for asymptomatic degenerative aortic and mitral valve disease. *Nature reviews Cardiology*. 2011;8(3):173-7.
110. Shah PK. Should severe aortic stenosis be operated on before symptom onset? Severe aortic stenosis should not be operated on before symptom onset. *Circulation*. 2012;126(1):118-25.
111. Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, Tuzcu EM, Webb JG, Fontana GP, Makkar RR, et al. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *The New England journal of medicine*. 2010;363(17):1597-607.
112. Smith CR, Leon MB, Mack MJ, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, Tuzcu EM, Webb JG, Fontana GP, Makkar RR, et al. Transcatheter versus surgical aortic-valve replacement in high-risk patients. *The New England journal of medicine*. 2011;364(23):2187-98.
113. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *The New England journal of medicine*. 2008;359(21):2195-207.
114. Ardehali R, Leeper NJ, Wilson AM, and Heidenreich PA. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins on the progression of aortic sclerosis and mortality. *The Journal of heart valve disease*. 2012;21(3):337-43.
115. Shah SJ, Ristow B, Ali S, Na BY, Schiller NB, and Whooley MA. Acute myocardial infarction in patients with versus without aortic valve sclerosis and effect of statin therapy (from the Heart and Soul Study). *The American journal of cardiology*. 2007;99(8):1128-33.
116. Pohle K, Maffert R, Ropers D, Moshage W, Stilianakis N, Daniel WG, and Achenbach S. Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation*. 2001;104(16):1927-32.
117. Shavelle DM, Takasu J, Budoff MJ, Mao S, Zhao XQ, and O'Brien KD. HMG CoA reductase inhibitor (statin) and aortic valve calcium. *Lancet*. 2002;359(9312):1125-6.
118. Rosenhek R, Rader F, Loho N, Gabriel H, Heger M, Klaar U, Schemper M, Binder T, Maurer G, and Baumgartner H. Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis. *Circulation*. 2004;110(10):1291-5.
119. Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Lauer MS, Sprecher DL, and Griffin BP. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation*. 2001;104(18):2205-9.
120. Bellamy MF, Pellikka PA, Klarich KW, Tajik AJ, and Enriquez-Sarano M. Association of cholesterol levels, hydroxymethylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitor treatment, and progression of aortic stenosis in the community. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(10):1723-30.
121. Aronow WS, Ahn C, Kronzon I, and Goldman ME. Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons. *The American journal of cardiology*. 2001;88(6):693-5.

122. Antonini-Canterin F, Popescu BA, Huang G, Korcova-Miertusova R, Rivaben D, Faggiano P, Pavan D, Piazza R, Bolis A, Ciavattone A, et al. Progression of aortic valve sclerosis and aortic valve stenosis: what is the role of statin treatment? *Italian heart journal : official journal of the Italian Federation of Cardiology*. 2005;6(2):119-24.
123. Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, Ni A, Tam J, and Investigators A. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Circulation*. 2010;121(2):306-14.
124. Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, Boon NA, Scottish Aortic S, and Lipid Lowering Trial IoRI. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *The New England journal of medicine*. 2005;352(23):2389-97.
125. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, Gerds E, Gohlke-Barwolf C, Holme I, Kesaniemi YA, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *The New England journal of medicine*. 2008;359(13):1343-56.
126. Hamilton-Craig I, Kostner K, Colquhoun D, and Woodhouse S. At sea with SEAS: the first clinical endpoint trial for ezetimibe, treatment of patients with mild to moderate aortic stenosis, ends with mixed results and more controversy. *Heart, lung & circulation*. 2009;18(5):343-6.
127. Milin AC, Vorobiof G, Aksoy O, and Ardehali R. Insights into aortic sclerosis and its relationship with coronary artery disease. *Journal of the American Heart Association*. 2014;3(5).
128. Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, Barros IM, Azevedo LF, Rocha-Goncalves F, and Rajamannan NM. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(5):554-61.
129. Panahi Y, Sahebkar A, Taghipour HR, Dadjou Y, Pishgoo B, and Rakhshankhah AS. Atorvastatin therapy is not associated with slowing the progression of aortic stenosis: findings of a randomized controlled trial. *Clinical laboratory*. 2013;59(3-4):299-305.
130. De Vecchis R, Di Biase G, Esposito C, Ciccarelli A, Cioppa C, Giasi A, Ariano C, and Cantatrione S. Statin use for nonrheumatic calcific aortic valve stenosis: a review with meta-analysis. *Journal of cardiovascular medicine*. 2013;14(8):559-67.
131. Parolari A, Tremoli E, Cavallotti L, Trezzi M, Kassem S, Loardi C, Veglia F, Ferrari G, Pacini D, and Alamanni F. Do statins improve outcomes and delay the progression of non-rheumatic calcific aortic stenosis? *Heart*. 2011;97(7):523-9.
132. Teo KK, Corsi DJ, Tam JW, Dumesnil JG, and Chan KL. Lipid lowering on progression of mild to moderate aortic stenosis: meta-analysis of the randomized placebo-controlled clinical trials on 2344 patients. *The Canadian journal of cardiology*. 2011;27(6):800-8.
133. Raggi P, Davidson M, Callister TQ, Welty FK, Bachmann GA, Hecht H, and Rumberger JA. Aggressive versus moderate lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic postmenopausal women: Beyond Endorsed Lipid Lowering with EBT Scanning (BELLES). *Circulation*. 2005;112(4):563-71.

134. Houslay ES, Cowell SJ, Prescott RJ, Reid J, Burton J, Northridge DB, Boon NA, Newby DE, Scottish Aortic S, and Lipid Lowering Therapy IoRtI. Progressive coronary calcification despite intensive lipid-lowering treatment: a randomised controlled trial. *Heart*. 2006;92(9):1207-12.
135. Arad Y, Spadaro LA, Roth M, Newstein D, and Guerci AD. Treatment of asymptomatic adults with elevated coronary calcium scores with atorvastatin, vitamin C, and vitamin E: the St. Francis Heart Study randomized clinical trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(1):166-72.
136. Lommi JI, Kovanen PT, Jauhiainen M, Lee-Rueckert M, Kupari M, and Helske S. High-density lipoproteins (HDL) are present in stenotic aortic valves and may interfere with the mechanisms of valvular calcification. *Atherosclerosis*. 2011;219(2):538-44.
137. Cagirci G, Cay S, Karakurt O, Durmaz T, Yazihan N, Canga A, Aydin C, Acikel S, Kilic H, Topaloglu S, et al. Paraoxonase activity might be predictive of the severity of aortic valve stenosis. *The Journal of heart valve disease*. 2010;19(4):453-8.
138. Yilmaz MB, Guray U, Guray Y, Cihan G, Caldir V, Cay S, Kisacik HL, and Korkmaz S. Lipid profile of patients with aortic stenosis might be predictive of rate of progression. *American heart journal*. 2004;147(5):915-8.
139. Zhao Y, Black AS, Bonnet DJ, Maryanoff BE, Curtiss LK, Leman LJ, and Ghadiri MR. In vivo efficacy of HDL-like nanolipid particles containing multivalent peptide mimetics of apolipoprotein A-I. *Journal of lipid research*. 2014;55(10):2053-63.
140. Luscher TF, Landmesser U, von Eckardstein A, and Fogelman AM. High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. *Circulation research*. 2014;114(1):171-82.
141. Choi BG, Vilahur G, Yadegar D, Viles-Gonzalez JF, and Badimon JJ. The role of high-density lipoprotein cholesterol in the prevention and possible treatment of cardiovascular diseases. *Current molecular medicine*. 2006;6(5):571-87.
142. Huang Y, DiDonato JA, Levison BS, Schmitt D, Li L, Wu Y, Buffa J, Kim T, Gerstenecker GS, Gu X, et al. An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. *Nature medicine*. 2014;20(2):193-203.
143. Speidl WS, Cimmino G, Ibanez B, Elmariah S, Hutter R, Garcia MJ, Fuster V, Goldman ME, and Badimon JJ. Recombinant apolipoprotein A-I Milano rapidly reverses aortic valve stenosis and decreases leaflet inflammation in an experimental rabbit model. *European heart journal*. 2010;31(16):2049-57.
144. Brilla CG, Funck RC, and Rupp H. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease. *Circulation*. 2000;102(12):1388-93.
145. Weinberg EO, Schoen FJ, George D, Kagaya Y, Douglas PS, Litwin SE, Schunkert H, Benedict CR, and Lorell BH. Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation*. 1994;90(3):1410-22.
146. Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, Grimm D, Muders F, Kromer EP, Riegger GA, and Schunkert H. Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension*. 1995;25(2):250-9.

147. Turcani M, and Rupp H. Heart failure development in rats with ascending aortic constriction and angiotensin-converting enzyme inhibition. *British journal of pharmacology*. 2000;130(7):1671-7.
148. Lopez B, Querejeta R, Varo N, Gonzalez A, Larman M, Martinez Ubago JL, and Diez J. Usefulness of serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I in assessment of the cardioreparative ability of antihypertensive treatment in hypertensive patients. *Circulation*. 2001;104(3):286-91.
149. Ngo DT, Stafford I, Sverdlov AL, Qi W, Wuttke RD, Zhang Y, Kelly DJ, Weedon H, Smith MD, Kennedy JA, et al. Ramipril retards development of aortic valve stenosis in a rabbit model: mechanistic considerations. *British journal of pharmacology*. 2011;162(3):722-32.
150. O'Brien KD, Probstfield JL, Caulfield MT, Nasir K, Takasu J, Shavelle DM, Wu AH, Zhao XQ, and Budoff MJ. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and change in aortic valve calcium. *Archives of internal medicine*. 2005;165(8):858-62.
151. Nadir MA, Wei L, Elder DH, Libianto R, Lim TK, Pauriah M, Pringle SD, Doney AD, Choy AM, Struthers AD, et al. Impact of renin-angiotensin system blockade therapy on outcome in aortic stenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;58(6):570-6.
152. Chockalingam A, Venkatesan S, Subramaniam T, Jagannathan V, Elangovan S, Alagesan R, Gnanavelu G, Dorairajan S, Krishna BP, Chockalingam V, et al. Safety and efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibitors in symptomatic severe aortic stenosis: Symptomatic Cardiac Obstruction-Pilot Study of Enalapril in Aortic Stenosis (SCOPE-AS). *American heart journal*. 2004;147(4):E19.
153. O'Brien KD, Zhao XQ, Shavelle DM, Caulfield MT, Letterer RA, Kapadia SR, Probstfield JL, and Otto CM. Hemodynamic effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, in patients with mild to moderate aortic stenosis and preserved left ventricular function. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2004;52(3):185-91.
154. Newby DE, Cowell SJ, and Boon NA. Emerging medical treatments for aortic stenosis: statins, angiotensin converting enzyme inhibitors, or both? *Heart*. 2006;92(6):729-34.
155. Aksoy Y, Yagmur C, Tekin GO, Yagmur J, Topal E, Kekilli E, Turhan H, Kosar F, and Yetkin E. Aortic valve calcification: association with bone mineral density and cardiovascular risk factors. *Coronary artery disease*. 2005;16(6):379-83.
156. Persy V, and D'Haese P. Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. *Trends in molecular medicine*. 2009;15(9):405-16.
157. Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, and Hofbauer LC. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcified tissue international*. 2004;74(1):103-6.
158. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England journal of medicine*. 2009;361(8):756-65.
159. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoc A, Kilic R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and

- osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;36(1):57-66.
160. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & development*. 1998;12(9):1260-8.
161. Price PA, Faus SA, and Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2001;21(5):817-24.
162. Rapoport HS, Connolly JM, Fulmer J, Dai N, Murti BH, Gorman RC, Gorman JH, Alferiev I, and Levy RJ. Mechanisms of the in vivo inhibition of calcification of bioprosthetic porcine aortic valve cusps and aortic wall with triglycidylamine/mercapto bisphosphonate. *Biomaterials*. 2007;28(4):690-9.
163. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985;228(4705):1315-7.
164. Deutscher SL. Phage display in molecular imaging and diagnosis of cancer. *Chemical reviews*. 2010;110(5):3196-211.
165. Lee S, Xie J, and Chen X. Peptide-based probes for targeted molecular imaging. *Biochemistry*. 2010;49(7):1364-76.
166. Hamzeh-Mivehroud M, Alizadeh AA, Morris MB, Church WB, and Dastmalchi S. Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013;18(23-24):1144-57.
167. Ebrahimzadeh W, and Rajabibazl M. Bacteriophage vehicles for phage display: biology, mechanism, and application. *Current microbiology*. 2014;69(2):109-20.
168. D'Onofrio N, Caraglia M, Grimaldi A, Marfella R, Servillo L, Paolisso G, and Balestrieri ML. Vascular-homing peptides for targeted drug delivery and molecular imaging: Meeting the clinical challenges. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1846(1):1-12.
169. Larimer BM, and Deutscher SL. Development of a peptide by phage display for SPECT imaging of resistance-susceptible breast cancer. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2014;4(5):435-47.
170. Arap W, and Pasqualini R. The human vascular mapping project. Selection and utilization of molecules for tumor endothelial targeting. *Haemostasis*. 2001;31 Suppl 1(30-1).
171. Arap W, Kolonin MG, Trepel M, Lahdenranta J, Cardo-Vila M, Giordano RJ, Mintz PJ, Ardelt PU, Yao VJ, Vidal CI, et al. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nature medicine*. 2002;8(2):121-7.
172. Beghetto E, and Gargano N. Lambda-display: a powerful tool for antigen discovery. *Molecules*. 2011;16(4):3089-105.
173. Kalnina Z, Silina K, Meistere I, Zayakin P, Rivosh A, Abols A, Leja M, Minenkova O, Schadendorf D, and Line A. Evaluation of T7 and lambda phage display systems for survey of autoantibody profiles in cancer patients. *Journal of immunological methods*. 2008;334(1-2):37-50.
174. Kurzepa A, Dabrowska K, Switala-Jelen K, and Gorski A. Molecular modification of T4 bacteriophage proteins and its potential application - review. *Folia microbiologica*. 2009;54(1):5-15.

175. Wilson DR, and Finlay BB. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Canadian journal of microbiology*. 1998;44(4):313-29.
176. Koivunen E, Arap W, Rajotte D, Lahdenranta J, and Pasqualini R. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1999;40(5):883-8.
177. Karlsson F. *Department of Immunotechnology*. Lund: Lund University; 2004:71.
178. Weigel C, and Seitz H. Bacteriophage replication modules. *FEMS microbiology reviews*. 2006;30(3):321-81.
179. Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, and Russel M. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Current issues in molecular biology*. 2011;13(2):51-76.
180. Vodnik M, Zager U, Strukelj B, and Lunder M. Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules*. 2011;16(1):790-817.
181. Smith GP, and Petrenko VA. Phage Display. *Chemical reviews*. 1997;97(2):391-410.
182. Lowman HB. Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 1997;26(401-24).
183. Derda R, Tang SK, Li SC, Ng S, Matochko W, and Jafari MR. Diversity of phage-displayed libraries of peptides during panning and amplification. *Molecules*. 2011;16(2):1776-803.
184. Brown KC. New approaches for cell-specific targeting: identification of cell-selective peptides from combinatorial libraries. *Current opinion in chemical biology*. 2000;4(1):16-21.
185. Bratkovic T. Progress in phage display: evolution of the technique and its application. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2010;67(5):749-67.
186. Schmitz U, Versmold A, Kaufmann P, and Frank HG. Phage display: a molecular tool for the generation of antibodies--a review. *Placenta*. 2000;21 Suppl A(S106-12).
187. Ludtke JJ, Solloff AV, Wong SC, Zhang G, and Wolff JA. In vivo selection and validation of liver-specific ligands using a new T7 phage peptide display system. *Drug delivery*. 2007;14(6):357-69.
188. Danner S, and Belasco JG. T7 phage display: a novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(23):12954-9.
189. Krumpke LR, Atkinson AJ, Smythers GW, Kandel A, Schumacher KM, McMahon JB, Makowski L, and Mori T. T7 lytic phage-displayed peptide libraries exhibit less sequence bias than M13 filamentous phage-displayed peptide libraries. *Proteomics*. 2006;6(15):4210-22.
190. Sathaliyawala T, Islam MZ, Li Q, Fokine A, Rossmann MG, and Rao VB. Functional analysis of the highly antigenic outer capsid protein, Hoc, a virus decoration protein from T4-like bacteriophages. *Molecular microbiology*. 2010;77(2):444-55.
191. Shivachandra SB, Li Q, Peachman KK, Matyas GR, Leppla SH, Alving CR, Rao M, and Rao VB. Multicomponent anthrax toxin display and delivery using bacteriophage T4. *Vaccine*. 2007;25(7):1225-35.
192. Shivachandra SB, Rao M, Janosi L, Sathaliyawala T, Matyas GR, Alving CR, Leppla SH, and Rao VB. In vitro binding of anthrax protective antigen on bacteriophage T4

- capsid surface through Hoc-capsid interactions: a strategy for efficient display of large full-length proteins. *Virology*. 2006;345(1):190-8.
193. Cerritelli ME, Conway JF, Cheng N, Trus BL, and Steven AC. Molecular mechanisms in bacteriophage T7 procapsid assembly, maturation, and DNA containment. *Advances in protein chemistry*. 2003;64(301-23).
 194. Novagen. T7Select System Manual. 2014.
 195. Heineman RH, and Bull JJ. Testing optimality with experimental evolution: lysis time in a bacteriophage. *Evolution; international journal of organic evolution*. 2007;61(7):1695-709.
 196. Pell LG, Kanelis V, Donaldson LW, Howell PL, and Davidson AR. The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(11):4160-5.
 197. Meyer JR, Dobias DT, Weitz JS, Barrick JE, Quick RT, and Lenski RE. Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda. *Science*. 2012;335(6067):428-32.
 198. Zucconi A, Dente L, Santonico E, Castagnoli L, and Cesareni G. Selection of ligands by panning of domain libraries displayed on phage lambda reveals new potential partners of synaptojanin 1. *Journal of molecular biology*. 2001;307(5):1329-39.
 199. Mikawa YG, Maruyama IN, and Brenner S. Surface display of proteins on bacteriophage lambda heads. *Journal of molecular biology*. 1996;262(1):21-30.
 200. Weidanz JA, Card KF, Edwards A, Perlstein E, and Wong HC. Display of functional alphabeta single-chain T-cell receptor molecules on the surface of bacteriophage. *Journal of immunological methods*. 1998;221(1-2):59-76.
 201. Sioud M, and Hansen MH. Profiling the immune response in patients with breast cancer by phage-displayed cDNA libraries. *European journal of immunology*. 2001;31(3):716-25.
 202. Jespers LS, Messens JH, De Keyser A, Eeckhout D, Van den Brande I, Gansemans YG, Lauwereys MJ, Vlasuk GP, and Stanssens PE. Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Bio/technology*. 1995;13(4):378-82.
 203. Hufton SE, Moerkerk PT, Meulemans EV, de Bruine A, Arends JW, and Hoogenboom HR. Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *Journal of immunological methods*. 1999;231(1-2):39-51.
 204. Kwasnikowski P, Kristensen P, and Markiewicz WT. Multivalent display system on filamentous bacteriophage pVII minor coat protein. *Journal of immunological methods*. 2005;307(1-2):135-43.
 205. Gao C, Mao S, Kaufmann G, Wirsching P, Lerner RA, and Janda KD. A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(20):12612-6.
 206. Tornetta M, Baker S, Whitaker B, Lu J, Chen Q, Pisors E, Shi L, Luo J, Sweet R, and Tsui P. Antibody Fab display and selection through fusion to the pIX coat protein of filamentous phage. *Journal of immunological methods*. 2010;360(1-2):39-46.

207. Loset GA, Roos N, Bogen B, and Sandlie I. Expanding the versatility of phage display II: improved affinity selection of folded domains on protein VII and IX of the filamentous phage. *PloS one*. 2011;6(2):e17433.
208. Tornetta M, Reddy R, and Wheeler JC. Selection and maturation of antibodies by phage display through fusion to pIX. *Methods*. 2012;58(1):34-9.
209. Loset GA, and Sandlie I. Next generation phage display by use of pVII and pIX as display scaffolds. *Methods*. 2012;58(1):40-6.
210. Nilssen NR, Frigstad T, Pollmann S, Roos N, Bogen B, Sandlie I, and Loset GA. DeltaPhage--a novel helper phage for high-valence pIX phagemid display. *Nucleic acids research*. 2012;40(16):e120.
211. Gao C, Mao S, Ronca F, Zhuang S, Quaranta V, Wirsching P, and Janda KD. De novo identification of tumor-specific internalizing human antibody-receptor pairs by phage-display methods. *Journal of immunological methods*. 2003;274(1-2):185-97.
212. Loset GA, Bogen B, and Sandlie I. Expanding the versatility of phage display I: efficient display of peptide-tags on protein VII of the filamentous phage. *PloS one*. 2011;6(2):e14702.
213. Kay BK, Kasanov J, and Yamabhai M. Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods*. 2001;24(3):240-6.
214. Russel M. Phage Display : A Pratical Approach. 2004;A (360).
215. Webster R. *Filamentous phage biology*. In *Phage Display : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
216. Russel MaM, P. In: Abedon ST ed. *The Bacteriophages*. Oxford University Press; 2005:146-60.
217. Sandman KE, and Noren CJ. The efficiency of Escherichia coli selenocysteine insertion is influenced by the immediate downstream nucleotide. *Nucleic acids research*. 2000;28(3):755-61.
218. Stricker NaL, M. *Phage Display technologies*. John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
219. Scott JKaB, C.F. *Phage display vectors*. In *Phage Display : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
220. Fellouse FAaP, G. *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery*. CRC Press; 2005:112-4.
221. Noren KA, and Noren CJ. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods*. 2001;23(2):169-78.
222. Arap W, Pasqualini R, and Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*. 1998;279(5349):377-80.
223. Fan X, Venegas R, Fey R, van der Heyde H, Bernard MA, Lazarides E, and Woods CM. An in vivo approach to structure activity relationship analysis of peptide ligands. *Pharmaceutical research*. 2007;24(5):868-79.
224. Castel G, Chteoui M, Heyd B, and Tordo N. Phage display of combinatorial peptide libraries: application to antiviral research. *Molecules*. 2011;16(5):3499-518.
225. Mersich C, and Jungbauer A. Generation of bioactive peptides by biological libraries. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2008;861(2):160-70.
226. Plosker GL, and Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*. 2003;63(8):803-43.

227. von Mehren M, Adams GP, and Weiner LM. Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annual review of medicine*. 2003;54(343-69).
228. Pini A, and Bracci L. Phage display of antibody fragments. *Current protein & peptide science*. 2000;1(2):155-69.
229. Tang Y, Jiang N, Parakh C, and Hilvert D. Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(26):15682-6.
230. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NB, and Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012(980250).
231. Azzazy HM, and Highsmith WE, Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical biochemistry*. 2002;35(6):425-45.
232. Pasqualini R, and Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*. 1996;380(6572):364-6.
233. Babickova J, Tothova L, Boor P, and Celec P. In vivo phage display--a discovery tool in molecular biomedicine. *Biotechnology advances*. 2013;31(8):1247-59.
234. Weissleder R. *Molecular Imaging: Principles and Practice*. People's Medical Publishing House-USA; 2010.
235. Zou J, Dickerson MT, Owen NK, Landon LA, and Deutscher SL. Biodistribution of filamentous phage peptide libraries in mice. *Molecular biology reports*. 2004;31(2):121-9.
236. Srivastava AS, Kaido T, and Carrier E. Immunological factors that affect the in vivo fate of T7 phage in the mouse. *Journal of virological methods*. 2004;115(1):99-104.
237. Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, Koivunen E, Pasqualini R, and Ruoslahti E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(2):430-7.
238. Kolonin MG, Sun J, Do KA, Vidal CI, Ji Y, Baggerly KA, Pasqualini R, and Arap W. Synchronous selection of homing peptides for multiple tissues by in vivo phage display. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(7):979-81.
239. Kelly KA, Nahrendorf M, Yu AM, Reynolds F, and Weissleder R. In vivo phage display selection yields atherosclerotic plaque targeted peptides for imaging. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*. 2006;8(4):201-7.
240. Kelly KA, Clemons PA, Yu AM, and Weissleder R. High-throughput identification of phage-derived imaging agents. *Molecular imaging*. 2006;5(1):24-30.
241. Peters EA, Schatz PJ, Johnson SS, and Dower WJ. Membrane insertion defects caused by positive charges in the early mature region of protein pIII of filamentous phage fd can be corrected by prlA suppressors. *Journal of bacteriology*. 1994;176(14):4296-305.
242. Biolabs NE. *Ph.D.TM Phage Display Libraries Instruction Manual*. 2014.
243. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Girard OM, Hanahan D, Mattrey RF, and Ruoslahti E. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer cell*. 2009;16(6):510-20.

244. Zurita AJ, Troncoso P, Cardo-Vila M, Logothetis CJ, Pasqualini R, and Arap W. Combinatorial screenings in patients: the interleukin-11 receptor alpha as a candidate target in the progression of human prostate cancer. *Cancer research*. 2004;64(2):435-9.
245. Rajotte D, and Ruoslahti E. Membrane dipeptidase is the receptor for a lung-targeting peptide identified by in vivo phage display. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(17):11593-8.
246. Kelly KA, Allport JR, Tsourkas A, Shinde-Patil VR, Josephson L, and Weissleder R. Detection of vascular adhesion molecule-1 expression using a novel multimodal nanoparticle. *Circulation research*. 2005;96(3):327-36.
247. Work LM, Nicol CG, Denby L, and Baker AH. In vivo biopanning: A methodological approach to identifying novel targeting ligands for delivery of biological agents to the vasculature. *Methods in molecular medicine*. 2005;108(395-413).
248. Ruoslahti E, Bhatia SN, and Sailor MJ. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *The Journal of cell biology*. 2010;188(6):759-68.
249. Teesalu T, Sugahara KN, and Ruoslahti E. Tumor-penetrating peptides. *Frontiers in oncology*. 2013;3(216).
250. Qinghua W, Jianli X, Lu L, Zexuan Y, Guansheng T, Hailin G, and Jianwei J. A radiolabeled nonapeptide probe targeting PC-3 cells and bone metastases of prostate cancer in mice. *Contrast media & molecular imaging*. 2012;7(2):223-30.
251. Staquicini FI, Cardo-Vila M, Kolonin MG, Trepel M, Edwards JK, Nunes DN, Sergeeva A, Efstathiou E, Sun J, Almeida NF, et al. Vascular ligand-receptor mapping by direct combinatorial selection in cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(46):18637-42.
252. Krag DN, Shukla GS, Shen GP, Pero S, Ashikaga T, Fuller S, Weaver DL, Burdette-Radoux S, and Thomas C. Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries. *Cancer research*. 2006;66(15):7724-33.
253. Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, and Arap W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Advanced drug delivery reviews*. 2006;58(15):1622-54.
254. Fricker G, and Kusters E. Intestinal absorption of sugar-coupled somatostatin analogs. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1996;85(11):1211-4.
255. Morishita M, and Peppas NA. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? *Drug discovery today*. 2006;11(19-20):905-10.
256. Vergote V, Burvenich C, Van de Wiele C, and De Spiegeleer B. Quality specifications for peptide drugs: a regulatory-pharmaceutical approach. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*. 2009;15(11):697-710.
257. Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, and de Souza M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug discovery today*. 2004;9(12):525-9.
258. Laakkonen P, and Vuorinen K. Homing peptides as targeted delivery vehicles. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*. 2010;2(7-8):326-37.
259. Gao H, Xiong Y, Zhang S, Yang Z, Cao S, and Jiang X. RGD and interleukin-13 peptide functionalized nanoparticles for enhanced glioblastoma cells and neovasculature dual targeting delivery and elevated tumor penetration. *Molecular pharmaceutics*. 2014;11(3):1042-52.

260. Larimer BM, Thomas WD, Smith GP, and Deutscher SL. Affinity Maturation of an ERBB2-Targeted SPECT Imaging Peptide by In Vivo Phage Display. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*. 2014;16(4):449-58.
261. Hui X, Han Y, Liang S, Liu Z, Liu J, Hong L, Zhao L, He L, Cao S, Chen B, et al. Specific targeting of the vasculature of gastric cancer by a new tumor-homing peptide CGNSNPKSC. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2008;131(2):86-93.
262. Witt H, Hajdin K, Iljin K, Greiner O, Niggli FK, Schafer BW, and Bernasconi M. Identification of a rhabdomyosarcoma targeting peptide by phage display with sequence similarities to the tumour lymphatic-homing peptide LyP-1. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;124(9):2026-32.
263. Chen X, Sievers E, Hou Y, Park R, Tohme M, Bart R, Bremner R, Bading JR, and Conti PS. Integrin alpha v beta 3-targeted imaging of lung cancer. *Neoplasia*. 2005;7(3):271-9.
264. Cheng Z, Wu Y, Xiong Z, Gambhir SS, and Chen X. Near-infrared fluorescent RGD peptides for optical imaging of integrin alphavbeta3 expression in living mice. *Bioconjugate chemistry*. 2005;16(6):1433-41.
265. Kwon S, Ke S, Houston JP, Wang W, Wu Q, Li C, and Sevick-Muraca EM. Imaging dose-dependent pharmacokinetics of an RGD-fluorescent dye conjugate targeted to alpha v beta 3 receptor expressed in Kaposi's sarcoma. *Molecular imaging*. 2005;4(2):75-87.
266. Wang W, Ke S, Wu Q, Charnsangavej C, Gurfinkel M, Gelovani JG, Abbruzzese JL, Sevick-Muraca EM, and Li C. Near-infrared optical imaging of integrin alphavbeta3 in human tumor xenografts. *Molecular imaging*. 2004;3(4):343-51.
267. Ye Y, Bloch S, Xu B, and Achilefu S. Design, synthesis, and evaluation of near infrared fluorescent multimeric RGD peptides for targeting tumors. *Journal of medicinal chemistry*. 2006;49(7):2268-75.
268. Karasseva NG, Glinsky VV, Chen NX, Komatireddy R, and Quinn TP. Identification and characterization of peptides that bind human ErbB-2 selected from a bacteriophage display library. *Journal of protein chemistry*. 2002;21(4):287-96.
269. Kumar SR, Quinn TP, and Deutscher SL. Evaluation of an ¹¹¹In-radiolabeled peptide as a targeting and imaging agent for ErbB-2 receptor expressing breast carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(20):6070-9.
270. Deutscher SL, Figueroa SD, and Kumar SR. In-labeled KCCYSL peptide as an imaging probe for ErbB-2-expressing ovarian carcinomas. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals*. 2009;52(14):583-90.
271. Howell RC, Revskaya E, Pazo V, Nosanchuk JD, Casadevall A, and Dadachova E. Phage display library derived peptides that bind to human tumor melanin as potential vehicles for targeted radionuclide therapy of metastatic melanoma. *Bioconjugate chemistry*. 2007;18(6):1739-48.
272. Kelly KA, Setlur SR, Ross R, Anbazhagan R, Waterman P, Rubin MA, and Weissleder R. Detection of early prostate cancer using a hepsin-targeted imaging agent. *Cancer research*. 2008;68(7):2286-91.

273. Kelly KA, Bardeesy N, Anbazhagan R, Gurumurthy S, Berger J, Alencar H, Depinho RA, Mahmood U, and Weissleder R. Targeted nanoparticles for imaging incipient pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS medicine*. 2008;5(4):e85.
274. Kelly KA, Waterman P, and Weissleder R. In vivo imaging of molecularly targeted phage. *Neoplasia*. 2006;8(12):1011-8.
275. Newton JR, Kelly KA, Mahmood U, Weissleder R, and Deutscher SL. In vivo selection of phage for the optical imaging of PC-3 human prostate carcinoma in mice. *Neoplasia*. 2006;8(9):772-80.
276. Thomas S, Waterman P, Chen S, Marinelli B, Seaman M, Rodig S, Ross RW, Josephson L, Weissleder R, and Kelly KA. Development of Secreted Protein and Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Targeted Nanoparticles for the Prognostic Molecular Imaging of Metastatic Prostate Cancer. *Journal of nanomedicine & nanotechnology*. 2011;2(112).
277. Kelly KA, Allport JR, Yu AM, Sinh S, Sage EH, Gerszten RE, and Weissleder R. SPARC is a VCAM-1 counter-ligand that mediates leukocyte transmigration. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(3):748-56.
278. Gendron ME, Theoret JF, Mamarbachi AM, Drouin A, Nguyen A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Merhi Y, and Thorin E. Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;298(6):H2062-70.
279. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, and team U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-7.
280. Sider KL, Blaser MC, and Simmons CA. Animal models of calcific aortic valve disease. *International journal of inflammation*. 2011;2011(364310).
281. Hinton RB, Jr., Alfieri CM, Witt SA, Glascock BJ, Khoury PR, Benson DW, and Yutzey KE. Mouse heart valve structure and function: echocardiographic and morphometric analyses from the fetus through the aged adult. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2008;294(6):H2480-8.
282. Guerraty M, and Mohler Iii ER. Models of aortic valve calcification. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2007;55(6):278-83.
283. Hjortnaes J, Butcher J, Figueiredo JL, Riccio M, Kohler RH, Kozloff KM, Weissleder R, and Aikawa E. Arterial and aortic valve calcification inversely correlates with osteoporotic bone remodelling: a role for inflammation. *European heart journal*. 2010;31(16):1975-84.
284. Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, Narumi T, Kadowaki S, Honda Y, Otaki Y, Hasegawa H, Netsu S, Funayama A, et al. A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(2):270-8.
285. Sabbah HN. Apoptotic cell death in heart failure. *Cardiovascular research*. 2000;45(3):704-12.
286. Hang T, Huang Z, Jiang S, Gong J, Wang C, Xie D, and Ren H. Apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy is mediated, in part, by adenine nucleotide translocator-1. *Ann Clin Lab Sci*. 2006;36(1):88-95.

287. Vengrenyuk Y, Carlier S, Xanthos S, Cardoso L, Ganatos P, Virmani R, Einav S, Gilchrist L, and Weinbaum S. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(40):14678-83.
288. Fogal V, Zhang L, Krajewski S, and Ruoslahti E. Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma. *Cancer research*. 2008;68(17):7210-8.