

Université de Montréal

**L'accélération de la rigidité vasculaire associée au diabète
de type 1**

Implication de la protéine Gla de la matrice

par

Marielle Doyon

Université de Montréal

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences Pharmaceutiques
option Pharmacologie

Octobre 2013

© Marielle Doyon, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
L'accélération de la rigidité vasculaire associée au diabète de type 1
Implication de la protéine Gla de la matrice

présentée par :
Marielle Doyon

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Denis deBlois, président-rapporteur
Dr. Pierre Moreau, directeur de recherche
Dr. Patrick Mathieu, co-directeur de recherche
Dr. Hélène Girouard, membre du jury
Dr. André Marette, examinateur externe
représentant du doyen de la FES

Résumé

L'hypertension systolique isolée (HSI), amenée par une augmentation de la rigidité vasculaire, est la forme d'hypertension la plus fréquente chez les personnes âgées de plus de 60 ans. L'augmentation de la rigidité vasculaire, causée en partie par la calcification aortique médiale, est accélérée de 15 ans chez les diabétiques. Il est suggéré que la calcification aortique serait responsable de la résistance aux agents antihypertenseurs chez les patients souffrant d'HSI, d'où la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant la calcification artérielle.

La protéine Gla de la matrice (MGP) est une protéine anti-calcifiante dépendante de la vitamine K, qui doit être γ -carboxylée pour être active. Deux enzymes sont responsables de la γ -carboxylation, soit la γ -glutamyl-carboxylase et la vitamine K époxyde réductase (VKOR). Plusieurs études récentes ont indiqué que la calcification vasculaire semblait être associée à une réduction de la γ -carboxylation de la MGP, et à un déficit en vitamine K. La modulation de l'expression et/ou de l'activité de la γ -carboxylase et de la VKOR et l'impact de cette modulation sur la γ -carboxylation de la MGP en présence de diabète n'est pas connue.

L'objectif principal de cette thèse était de déterminer les mécanismes impliqués dans l'accélération de la rigidité artérielle causée par la calcification des gros troncs artériels dans le diabète. Nous avons ainsi confirmé, dans un modèle animal de rigidité artérielle en présence de diabète de type 1, que la γ -carboxylation de la MGP était bel et bien altérée au niveau aortique. En fait, nous avons démontré que la quantité de MGP active (*i.e.* MGP γ -carboxylée, *cMGP*) au sein de la paroi vasculaire est diminuée significativement. Parallèlement, l'expression de la γ -carboxylase était diminuée de façon importante, alors que ni l'expression ni l'activité de la VKOR n'étaient modifiées.

La diminution de l'expression de la γ -carboxylase a pu être reproduite dans un modèle *ex vivo* d'hyperglycémie. À l'aide de ce modèle, nous avons démontré que la supplémentation en vitamine K dans le milieu de culture prévenait la diminution de l'expression de la γ -carboxylase, alors que les animaux diabétiques de notre modèle *in vivo* avaient des

concentrations plasmatiques de vitamine K pratiquement triplées. D'autre part, l'étude des voies de signalisation impliquées a révélé que la voie PKC β pourrait être responsable de l'altération de la γ -carboxylase.

Ces résultats génèrent de nouvelles pistes de réflexion et de nouvelles idées de recherche. Par exemple, il serait important de vérifier l'effet de la supplémentation en vitamine K dans le modèle animal de rigidité artérielle en présence de diabète pour évaluer l'effet sur la γ -carboxylation de la MGP et par le fait même, sur la calcification vasculaire. De plus, l'évaluation de l'effet de l'administration de molécules ciblant la voie PKC chez ce même modèle animal permettrait de déterminer leur impact sur le développement de la calcification vasculaire et d'évaluer leur potentiel thérapeutique. Selon les résultats de ces études, de nouvelles options pourraient alors être à notre disposition pour prévenir ou traiter la calcification artérielle médiale associée au diabète, ce qui aurait pour effet de ralentir le développement de la rigidité artérielle et d'ainsi diminuer le risque cardiovasculaire associé à l'HSI.

Mots-clés : Calcification artérielle, rigidité vasculaire, diabète, protéine Gla de la matrice

Abstract

Arterial stiffness contributes to the development of isolated systolic hypertension (ISH), the most prevalent form of hypertension in the elderly. Arterial stiffness, due in part to the calcification of large arteries, is accelerated by 15 years in diabetic patients. It is suggested that vascular calcification could be responsible for the resistance to anti-hypertensive agents in patients suffering from ISH, emphasizing the need of developing new therapies directly targeting vascular calcification.

The matrix Gla protein (MGP) is a vitamin K-dependent secretory protein *post*-transitionally modified by the enzyme γ -glutamyl-carboxylase. This *post*-translational modification renders MGP active, *i.e.* able to inhibit vascular calcification (*c*MGP). Another enzyme, the vitamin K oxidoreductase (VKOR) is necessary to ensure the recycling of vitamin K from the epoxide to hydroquinone, the form used by the γ -carboxylase. Recent studies have shown that vascular calcification is associated with increased levels of under-carboxylated MGP (*uc*MGP), and vitamin K deficiency. However, the modulation of the expression or the activity of the enzymes involved in γ -carboxylation, as well as the impact of this modulation is currently unknown.

The goal of this research project was to study the mechanisms involved in the accelerated development of arterial stiffness in diabetes due to increased vascular calcification of large arteries. In a rat model of type 1 diabetes with increased arterial stiffness, we demonstrated that aortic MGP γ -carboxylation was altered. In fact, the amount of active MGP was reduced in the arterial wall, coupled with a marked reduction of γ -carboxylase expression. However, neither VKOR expression nor activity was modified.

This alteration of the γ -carboxylase was reproduced in an *ex vivo* model of hyperglycemia. In this model, vitamin K supplementation prevented the reduction of γ -carboxylase expression, whereas surprisingly, plasma levels of vitamin K were increased in diabetic rats compared to controls. The PKC signaling pathway has been identified as the pathway involved in the γ -carboxylase alteration.

Our results provide multiple new research ideas. For instance, it would be important to study the effect of vitamin K supplementation in an animal model of diabetes-associated arterial stiffness, to gain insight into its impact on γ -carboxylase and MGP γ -carboxylation, and ultimately on vascular calcification. Moreover, it would be very interesting to determine the effect of molecules affecting the PKC pathway on vascular calcification in this model, which would allow for a better understanding of their therapeutic potential. Depending on the results of these experiments, we could have at our disposition new therapeutic options to prevent and treat vascular calcification, which would have the potential to slow down the acceleration of arterial stiffness in diabetic patients and reduce the cardiovascular risk associated with ISH.

Keywords : Vascular calcification, arterial stiffness, diabetes, *matrix Gla protein*

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xv
CHAPITRE 1. Introduction	1
1.1. FONCTIONS DU SYSTÈME ARTÉRIEL	3
1.1.1. Propriétés mécaniques des artères de conductance	3
1.1.2. Ondes de pression	8
1.1.3. Ondes de débit	11
1.2. RELATION STRUCTURE-FONCTION DES ARTÈRES DE CONDUCTANCE	12
1.2.1. Tunica Intima	14
1.2.2. Tunica Media	15
1.2.2.1. L'élastine.....	16
1.2.2.2. Les cellules de muscle lisse vasculaire.....	19
1.2.2.3. Le collagène	20
1.2.3. Tunica Adventitia	20
1.3. VIEILLISSEMENT VASCULAIRE	21
1.3.1. Augmentation de la rigidité artérielle	21
1.3.1.1. Indices de rigidité artérielle.....	24
1.3.1.2. La rigidité artérielle comme facteur de risque cardiovasculaire.....	27
1.3.1.2.1. <i>Hypertension systolique isolée</i>	27
1.3.1.2.2. <i>Augmentation de la vitesse de l'onde de pouls</i>	28
1.3.1.3. Dommages aux organes-cibles	29
1.3.1.3.1. <i>Reins et cerveau</i>	29
1.3.1.3.2. <i>Cœur</i>	30
1.3.2. Modifications des propriétés élastiques des artères de conductance	31
1.3.2.1. Fibrose	34

1.3.2.2.	Dégradation de l'élastine	34
1.3.2.3.	Calcification vasculaire	35
1.3.2.3.1.	<i>Calcification intimale</i>	36
1.3.2.3.2.	<i>Calcification médiale</i>	36
1.3.3.	Mécanismes impliqués dans le développement de la calcification vasculaire	37
1.3.3.1.	Apoptose des cellules de muscle lisse vasculaire	37
1.3.3.2.	Désordres du métabolisme osseux.....	38
1.3.3.3.	Facteurs pro-calcifiants	39
1.3.3.4.	Facteurs anti-calcifiants.....	44
1.3.4.	La protéine Gla de la matrice.....	45
1.3.4.1.	Présentation et rôles.....	45
1.3.4.2.	Modifications <i>post</i> -translationnelles	46
1.3.4.2.1.	<i>γ</i> -Carboxylation	46
1.3.4.2.2.	<i>Phosphorylation</i>	48
1.3.4.3.	Enzymes impliquées dans la <i>γ</i> -carboxylation de la MGP	48
1.3.4.3.1.	<i>γ</i> -Carboxylase.....	48
1.3.4.3.2.	<i>VKOR</i>	55
1.3.4.4.	Mécanismes d'inhibition de la calcification par la MGP.....	58
1.3.4.5.	Situations pathologiques liées à l'altération de la MGP	60
1.3.4.6.	MGP circulante vs. tissulaire	61
1.3.5.	La vitamine K en lien avec la calcification vasculaire	63
1.3.5.1.	Impact de la supplémentation en vitamine K.....	64
1.3.5.2.	Impact de la vitamine K <i>in vitro</i>	65
1.3.6.	Interaction entre la MGP et la vitamine D	66
1.3.7.	Paradoxe ostéoporose/calcification vasculaire.....	67
1.3.7.1.	L'ostéocalcine.....	67
1.3.8.	Options thérapeutiques pour le traitement de la calcification vasculaire.....	68
1.3.8.1.	Bisphosphonates	69
1.3.8.2.	Médicaments chélateurs du phosphate	69
1.3.8.3.	Thiosulfate.....	70
1.3.8.4.	Antagonistes du récepteur à l'endothéline.....	70
1.3.8.5.	Denosumab.....	71
1.3.8.6.	Bloqueurs de canaux calciques	71
1.3.8.7.	Inhibiteurs de la voie de l'angiotensine	71
1.3.9.	Modèles animaux présentant de la calcification artérielle médiale	72

1.3.9.1.	Modèles chez le rat	72
1.3.9.1.1.	<i>Modèle de vieillissement</i>	72
1.3.9.1.2.	<i>Application de chlorure de calcium</i>	73
1.3.9.1.3.	<i>Vitamine D</i>	74
1.3.9.1.4.	<i>Warfarine/vitamine K</i>	74
1.3.9.2.	Modèles chez la souris	75
1.3.9.2.1.	<i>Souris MGP -/-</i>	75
1.3.9.2.2.	<i>Souris OPG -/-</i>	75
1.3.9.2.3.	<i>Souris Anhydrase Carbonique II -/-</i>	76
1.4.	LE DIABÈTE ET LE VIEILLISSEMENT VASCULAIRE	76
1.4.1.	Accélération de la rigidité artérielle.....	76
1.4.2.	Mécanismes cellulaires à l'origine de la calcification précoce des vaisseaux en présence d'hyperglycémie	78
1.4.2.1.	Changements phénotypiques des cellules de muscle lisse vasculaire	79
1.4.2.2.	Augmentation de l'expression de l'ostéopontine.....	80
1.4.2.3.	AGEs	81
1.4.3.	Implication possible de la MGP	82
1.4.4.	Altération de la γ-carboxylation dans le diabète.....	83
1.4.5.	Altération du métabolisme des lipides dans le diabète	84
1.4.6.	Cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de la calcification vasculaire associée au diabète	86
1.4.6.1.	Dkk1	86
1.4.6.2.	AGEs	87
1.5.	MODÈLES ANIMAUX DE CALCIFICATION ARTÉRIELLE MÉDIALE ASSOCIÉE AU DIABÈTE	88
1.5.1.1.	Vitamine D/Streptozotocine.....	88
1.5.1.2.	Modèle d'accélération de la calcification artérielle médiale associée au diabète	88
CHAPITRE 2.	Objectifs	90
2.1.	PROBLÉMATIQUE	91
2.2.	OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	92
CHAPITRE 3.	Méthodes	94
3.1.	DÉVELOPPEMENT DU MODÈLE DE CALCIFICATION ARTÉRIELLE MÉDIALE EN PRÉSENCE DE DIABÈTE.....	95

3.2.	ACTIVITÉ DE LA Γ -CARBOXYLASE	97
3.3.	MARQUAGE VON KOSSA	98
3.4.	MGP PLASMATIQUE	99
3.5.	DÉTERMINATION DES VOIES SIGNALÉTIQUES IMPLIQUÉES.....	99
CHAPITRE 4. Résultats		102
4.1.	DECREASED EXPRESSION OF Γ -CARBOXYLASE IN DIABETES-ASSOCIATED ARTERIAL STIFFNESS: IMPACT ON MATRIX GLA PROTEIN	103
4.1.1.	Abrégé	104
4.1.2.	Abstract.....	105
4.1.3.	Introduction	106
4.1.4.	Methods.....	107
4.1.4.1.	Animal procedures.....	107
4.1.4.2.	Vascular calcification	108
4.1.4.3.	Collagen content	109
4.1.4.4.	Immunoblotting	109
4.1.4.5.	Immunofluorescence	110
4.1.4.6.	Aortic microsomes.....	110
4.1.4.7.	VKOR enzymatic activity	110
4.1.4.8.	Vitamin K plasmatic concentrations.....	110
4.1.4.9.	Osteocalcin plasmatic concentrations.....	111
4.1.4.10.	<i>Ex vivo</i> experiments.....	111
4.1.4.11.	Statistical analysis.....	111
4.1.5.	Results	112
4.1.5.1.	Animal model of diabetes-associated arterial stiffness	112
4.1.5.2.	γ -carboxylation of MGP	112
4.1.5.3.	Aortic expression of γ -carboxylase.....	113
4.1.5.4.	Aortic expression and activity of VKOR.....	113
4.1.5.5.	Vitamin K plasmatic concentrations.....	113
4.1.5.6.	Osteocalcin plasmatic concentrations.....	113
4.1.5.7.	<i>Ex vivo</i> model of hyperglycemia	113
4.1.6.	Discussion.....	114
4.1.7.	Acknowledgements	118
4.1.8.	Funding	118

4.1.9. References	118
4.1.10. Legends	123
4.1.11. Figures.....	125
4.1.11.1. Table.....	125
4.1.11.2. Figure 1.....	126
4.1.11.3. Figure 2.....	127
4.1.11.4. Figure 3.....	128
4.1.11.5. Figure 4.....	129
4.1.11.6. Figure 5.....	130
4.1.11.7. Figure 6.....	131
4.1.12. Supplementary data.....	132
4.1.12.1. Supplementary methods	132
4.1.12.1.1. <i>S.1 Aortic microsomes</i>	132
4.1.12.1.2. <i>S.2 VKOR enzymatic activity</i>	132
4.1.12.1.3. <i>S.3 Vitamin K plasmatic concentrations</i>	133
4.1.12.1.4. <i>S.4 Cardiomyocytes cross-sectional area</i>	133
4.1.12.2. Supplementary Figure Legend.....	134
4.1.12.3. Supplementary references	135
4.2. RÉSULTATS ADDITIONNELS	136
4.2.1. Développement du modèle Vitamine D/Streptozotocine	136
4.2.1.1. Administration de vitamine D uniquement.....	136
4.2.1.2. Combinaison vitamine D/Streptozotocine	140
4.2.2. MGP plasmatique	142
4.2.3. Identification des voies de signalisation impliquées dans l'altération de la γ-carboxylase	143
CHAPITRE 5. Discussion et perspectives.....	146
5.1. RAPPEL DU BESOIN THÉRAPEUTIQUE	147
5.2. POINT DE MIRE: LA MGP ET LES ENZYMES IMPLIQUÉES DANS SON ACTIVATION .	149
5.2.1. Développement du modèle.....	149
5.2.2. MGP	152
5.2.2.1. MGP plasmatique	153
5.2.3. γ-carboxylase.....	153
5.2.4. VKOR.....	154

5.2.5. Modèle <i>ex vivo</i>	155
5.2.6. PKC: la voie de signalisation impliquée dans la modulation de la γ -carboxylase en présence de diabète	156
5.3. AVENUES THÉRAPEUTIQUES POTENTIELLES	157
5.3.1. Molécules ciblant la voie PKC.....	157
5.3.2. Vitamine E	159
5.3.3. Ramipril.....	160
5.4. NOUVELLES AVENUES DE RECHERCHE	160
CHAPITRE 6. Bibliographie.....	164

Liste des tableaux

Tableau I: Définition des différents indices utilisés pour caractériser la rigidité artérielle.	24
Tableau II: Liste des protéines VKD.	50
Tableau III: Modèles murins de calcification vasculaire.	76
Tableau IV: Description des doses, des interventions, de la durée du traitement ainsi que du nombre d'animaux utilisé pour l'étude pilote sur la vitamine D.	96
Tableau V: Description des interventions, de la durée du traitement ainsi que du nombre d'animaux utilisé pour l'étude pilote sur la vitamine D combinée à la présence de T1DM induit par la STZ.	97
Tableau VI: Inhibiteurs de voies de signalisation et leur concentration de travail.	100

Liste des figures

Figure 1: Non-linéarité de la relation déformation-contrainte pour les vaisseaux de gros calibre.	6
Figure 2: Courbe pression-diamètre de l'artère carotide commune.	6
Figure 3: Transition de la contribution de l'élastine au collagène dans une aorte humaine.	7
Figure 4: Amplification de l'onde de pression le long de l'arbre vasculaire.	9
Figure 5: Tracés des parcours des ondes de pression.	10
Figure 6: Comparaison des ondes de pression et de débit enregistrées à cinq sites physiologiques chez le chien.	11
Figure 7: Impact de l'absence de collagène ou d'élastine dans la composition d'un vaisseau sur la tension développée lors de l'étirement.	13
Figure 8: Lien entre les différents éléments impliqués dans la relation structure-fonction des vaisseaux de conductance.	14
Figure 9: Disposition spatiale des cellules de muscle lisse, de l'élastine et du collagène dans la tunica media.	16
Figure 10: Composition d'une coupe transversale d'un vaisseau de conductance.	16
Figure 11: Évolution de la VOP selon l'âge.	21
Figure 12: Retour précoce de l'onde de pression.	22
Figure 13: Mesure de l'index d'augmentation de la pression.	23
Figure 14: Mesure de la VOP.	25
Figure 15: Conséquences pathologiques du vieillissement vasculaire sur le système cardiovasculaire.	31
Figure 16: Relation entre l'étirement d'un vaisseau et la fatigue du réseau élastique.	32
Figure 17: Évolution de la composition relative et absolue en élastine et en collagène d'un vaisseau selon l'âge.	33
Figure 18: Boucle autocrine impliquant BMP-2, Wnt, ALP.	41
Figure 19: Signalisation paracrine impliquant Msx-2.	42

Figure 20: Implication du co-transporteur Pit-1 dans le développement de la calcification vasculaire.	43
Figure 21: Séquence d'acides aminés de la MGP.	46
Figure 22: Cycle de la vitamine K et γ -carboxylation des résidus Glu.	48
Figure 23: Topologie membranaire de la γ -carboxylase.	49
Figure 24: Les sites de liaison de la γ -carboxylase.	51
Figure 25: Organisation des différents domaines de protéines VKD comme l'ostéocalcine et la MGP.	52
Figure 26: Processus de γ -carboxylation.	53
Figure 27: Topologie membranaire de la VKOR.	56
Figure 28: Mécanisme proposé pour expliquer le relais d'électrons nécessaire à l'activité de la VKOR.	57
Figure 29: Liaison des résidus Gla au calcium de l'hydroxyapatite.	59
Figure 30: Différentes formes de la vitamine K.	64
Figure 31: Augmentation de la vitesse de l'onde de pouls en fonction de l'âge chez le rat normotendu.	73
Figure 32: Prévalence de l'hypertension systolique isolée chez les patients diabétiques comparativement aux patients contrôles.	77
Figure 33: Comparaison des courbes de vieillissement pour un vaisseau normal comparativement à un vaisseau âgé.	78
Figure 34: Voie de signalisation Wnt.	80
Figure 35: Métabolisme de la vitamine K.	85
Figure 36: Effet de l'administration de vitamine D, à différentes doses, sur le contenu en calcium de diverses artères de rats Wistar sacrifiés après 1 ou 2 mois.	137
Figure 37: Marquage Von Kossa sur des coupes d'aorte thoracique de rats Wistar ayant reçu de la vitamine D à une dose de 300 000 UI et sacrifiés après 2 mois.	138
Figure 38: Effet de l'administration de vitamine D, à différentes doses, sur les paramètres hémodynamiques chez des rats Wistar sacrifiés après 1 ou 2 mois.	139
Figure 39: Effet de l'administration de vitamine D, seule ou combinée à la présence de diabète, sur le contenu en calcium de l'aorte thoracique chez des rats Wistar sacrifiés après 1 ou 2 mois.	140

Figure 40: Effet de l'administration de vitamine D, seule ou combinée à la présence de diabète, sur les paramètres hémodynamiques des rats Wistar sacrifiés après 1 ou 2 mois.....	141
Figure 41: Effet du diabète sur les concentrations plasmatiques de MGP chez des rats Wistar, après 2 mois de diabète de type 1.....	142
Figure 42: Effet de l'administration d'inhibiteurs de voies de signalisation sur l'expression de de la γ -carboxylase en milieu hyperglycémique – Étude pilote.....	144
Figure 43: Identification de la voie PKC β comme voie de signalisation potentiellement impliquée dans l'altération de l'expression de la γ -carboxylase.....	145
Figure 44: Synthèse <i>de novo</i> du DAG en présence d'hyperglycémie, menant à l'activation de la PKC.....	157
Figure 45: Structure du LY333531.....	158
Figure 46: Conceptualisation des résultats.....	163

Liste des abréviations

AGE: *advanced glycation endproduct*
ALP: alkaline phosphatase
AMP: adénosine monophosphate
APO: apolipoprotéine
AngII: angiotensine II
BMP-2: *bone morphogenetic protein-2*
CaCl₂: chlorure de calcium
cMGP: MGP carboxylée
CMLV: cellule de muscle lisse vasculaire
cOC: ostéocalcine carboxylée
CR: chylomicron remnant
CVC: cellules vasculaires calcifiantes
DAG: diacylglycérol
DKK1: *dickkopf related protein-1*
DTT: dithiothreitol
Erk: *extracellular signal-regulated kinases*
ET: endothéline
ETRA: antagoniste des récepteurs à l'endothéline
FGF: *fibroblast growth factor*
Gla: γ -carboxyglutamate
HDL: *high density lipoprotein*
HG: hyperglycémique
HSI: hypertension systolique isolée
HSPG: protéoglycanes héparane sulfate
IA: index d'augmentation
IECA: inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
KH₂: K hydroquinone
KO: K époxyde
LDL: *low density lipoprotein*
LDLR: *low density lipoprotein receptor*
LEI: lamelle élastique interne
LEE: lamelle élastique externe
LRP: *LDL receptor-related protein*
Lys: lysine
MEC: matrice extracellulaire
MGP: *matrix Gla protein*
MK: ménaquinone
MMP: métalloprotéinase matricielle
Msx-2: *Msh homebox 2*
NG: normoglycémique
OC: ostéocalcine
OPG: ostéoprotégérine

OPN: ostéopontine
PAM: pression artérielle moyenne
PDGF: *platelet derived growth factor*
PDI: *protein disulfide isomerase*
Pi: phosphate
Pit-1: *phosphate transporter-1*
PKC: protéine kinase C
Pd: pression diastolique
PP: pression pulsée
Ps: pression systolique
RAGE: récepteur des AGEs
RANKL: *receptor activator of nuclear factor κ β ligand*
RE: réticulum endoplasmique
Runx2: *Runt-related transcription factor 2*
SEM: *standard error of the mean*
SNP: *single nucleotide polymorphism*
SRA: système rénine-angiotensine
sRAGE: *soluble RAGE*
STZ: streptozotocine
T1DM: *type 1 diabetes mellitus*
T2DM: *type 2 diabetes mellitus*
TGF β : *transforming growth factor beta*
TNF: *tumor necrosis factor*
TRL: *triglyceride-rich lipoprotein*
Trx: thiorédoxine
ucOC: ostéocalcine non-carboxylée
ucMGP: MGP non-carboxylée
VDN: vitamine D/nicotine
VEGF: *Vascular endothelial growth factor*
VOP: vitesse de l'onde de pouls
VKD: protéine dépendante de la vitamine K
VKOR: vitamine K époxyde réductase
VLDL: *very low density lipoprotein*
WVK: warfarine/vitamine K

À mon père

Remerciements

Mes plus sincères remerciements à tous ceux et celles qui, de loin ou de proche, ont contribué à la réalisation de cette thèse. Un merci tout particulier au Dr. Pierre Moreau pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et soutenue durant toutes ces années.

CHAPITRE 1. Introduction

L'introduction de cette thèse permet de décrire le contexte scientifique dans lequel se situe le projet de recherche au cœur de mes études doctorales. La première partie consiste en un bref rappel de la structure et de la fonction des vaisseaux sanguins, plus spécifiquement des gros troncs artériels. Par la suite, l'atteinte pathologique sur laquelle porte nos travaux de recherche est décrite. Cette atteinte est le développement de la rigidité artérielle, amenée en partie par la calcification vasculaire, lors du vieillissement. De façon plus précise, la problématique qui nous a intéressés est l'accélération de la rigidité artérielle associée au diabète. Les traitements pharmacologiques susceptibles de contribuer à l'amélioration de la calcification vasculaire sont présentés. L'existence d'un besoin thérapeutique non comblé est établie et par le fait même, la nécessité de concentrer des efforts de recherche vers la découverte de nouvelles cibles pharmacologiques pour prévenir ou traiter la calcification vasculaire dans le diabète.

1.1. Fonctions du système artériel

Le système circulatoire du corps humain est composé du cœur et des vaisseaux sanguins. Le cœur agit en tant que pompe, éjectant près de 60 fois par minute un nouveau volume de sang oxygéné dans l'aorte, puis tout au long du réseau d'artères vers les différents organes du corps. C'est ce qu'on appelle la circulation systémique, chargée d'irriguer les tissus des organes périphériques de façon continue. La circulation pulmonaire, quant à elle, assure la réoxygénation du sang grâce aux échanges gazeux avec l'air ambiant. Trois types de vaisseaux sont impliqués dans la circulation sanguine: les artères, les capillaires et les veines. Chacun de ces types de vaisseaux possède des propriétés particulières leur permettant de remplir leur rôle adéquatement. De plus, selon leur proximité par rapport au cœur, les artères ont elles aussi des fonctions différentes à remplir et par le fait même, des caractéristiques structurales qui leur sont propres. L'aorte et ses embranchements, soit la carotide gauche, la sous-clavière gauche et l'artère brachio-céphalique, constituent les gros troncs artériels, appelés aussi artères de conduction. Les ramifications des gros troncs artériels sont les artères de distribution, aussi appelées artères musculaires. Finalement, les artères de distribution se ramifient à leur tour pour former le réseau d'artères de résistance comprenant les petites artères et les artérioles.

1.1.1. Propriétés mécaniques des artères de conductance

Les gros troncs artériels ont comme principale fonction d'assurer la connexion entre le cœur et les organes et ainsi de conduire le sang vers les organes périphériques, d'où leur appellation "vaisseaux de conductance". En plus de la fonction de conduit, les gros troncs artériels assurent l'amortissement du flot pulsé de sang lors des battements de cœur et le transforme en un débit sanguin continu, capable d'irriguer les organes de façon constante. Ce sont les propriétés élastiques de ce type de vaisseaux qui leur permettent de remplir ces deux fonctions. La proportion de fibres élastiques dans les gros vaisseaux peut s'élever jusqu'à 40%¹, le reste des constituants étant le collagène, les cellules de muscle lisse vasculaire (CMLV) et les cellules endothéliales. En comparaison, les artères musculaires ne se

composent que de 10% de fibres élastiques. Cette proportion élevée de fibres élastiques permet aux gros vaisseaux d'emmagasiner environ 50% du volume sanguin éjecté lors de la systole, l'autre 50% étant dirigé directement vers les organes périphériques². Lors de la diastole, la fermeture de la valve aortique empêche le sang de revenir vers le ventricule gauche, et la détente de l'aorte distendue lors de la systole force le sang vers la périphérie à nouveau. Cette capacité à transformer le flot sanguin pulsé en un flot continu est appelée l'effet *Windkessel*, faisant référence à la capacité de l'aorte d'agir en tant que réservoir élastique³ en opposition à un tube rigide. Dans ce modèle, l'aorte et ses embranchements jouent donc les rôles de réservoir et d'amortisseur. L'utilisation du modèle *Windkessel* à deux éléments a permis de caractériser mathématiquement la circulation artérielle en prenant en considération les paramètres de résistance artérielle et de compliance.

La résistance artérielle se rapporte à la résistance qu'offre le réseau d'artérioles, due à la composition musculaire de ce type d'artères. Le diamètre des vaisseaux a alors un impact majeur sur cette résistance. En effet, la résistance pouvant être définie par la relation de Poiseuille:

$$R = \frac{8\eta l}{\pi r^4}$$

où η est la viscosité, l est la longueur et r est le rayon du tube, il est possible de constater qu'elle est inversement proportionnelle à la quatrième puissance du rayon du vaisseau.

La compliance (C), pour sa part, rend compte de la facilité d'un vaisseau à se distendre sous l'effet de la pression, et est définie par l'équation:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P}$$

Ainsi, l'équation décrit le changement de volume suite à un changement donné de la pression artérielle. D'autres termes peuvent être utilisés pour faire référence à la compliance: la capacitance ou la distensibilité volumique.

La réciproque de la compliance est appelée la résistance élastique, ou élastance (E), définie par l'équation:

$$E = \frac{\Delta P}{\Delta V}$$

L'élastance représente la résistance qu'offre le vaisseau à l'étirement, lorsque le volume augmente. À titre d'exemple, la pression systolique sera supérieure dans l'artère fémorale comparativement à la pression systolique dans l'aorte, puisque son élastance est plus élevée que celle de l'aorte.

En considérant les gros troncs artériels comme des tubes élastiques, capables de reprendre leur forme après un étirement donné, il est possible de décrire cet étirement par le module de Young⁴:

$$E = \frac{\sigma_t}{\varepsilon_t}$$

où σ_t représente la contrainte (pression) et ε_t représente la déformation relative. Alors que la compliance d'un vaisseau rend compte des propriétés élastiques d'un vaisseau en tant que tube creux, cette relation se rapporte aux propriétés élastiques des composantes de la paroi artérielle, indépendamment de sa géométrie⁵. Cette relation est linéaire, décrivant un phénomène pour lequel la déformation est proportionnelle à la force, c'est-à-dire suivant la loi de Hooke. En réalité, la relation contrainte-déformation pour les vaisseaux sanguins n'est pas linéaire, et ne suit donc pas la loi de Hooke⁶⁻⁸. En effet, les artères deviennent plus rigides à mesure qu'elles sont distendues (Figure 1). Ainsi, les vaisseaux possèdent également des propriétés visqueuses notamment grâce aux CMLV qui les composent⁹, ce qui en fait un matériau viscoélastique capable de dissiper de l'énergie et donc d'amortir l'onde de pression^{10,11}. Les propriétés visqueuses de la paroi artérielle font en sorte que même après le retrait de la force appliquée, une partie de la déformation reste présente. Cette dissipation d'énergie se manifeste par une hystérèse anti-horaire sur un graphique de pression en fonction du diamètre⁵ (Figure 2).

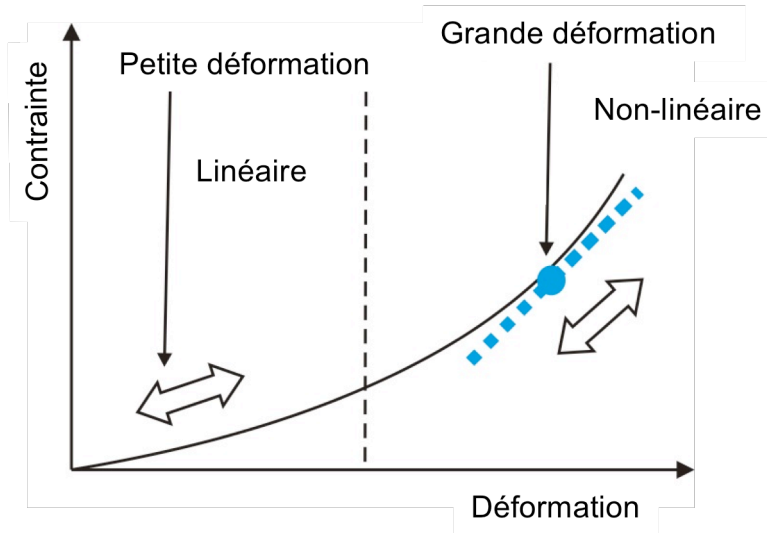


Figure 1: Non-linéarité de la relation déformation-contrainte pour les vaisseaux de gros calibre.

Adapté de ¹².

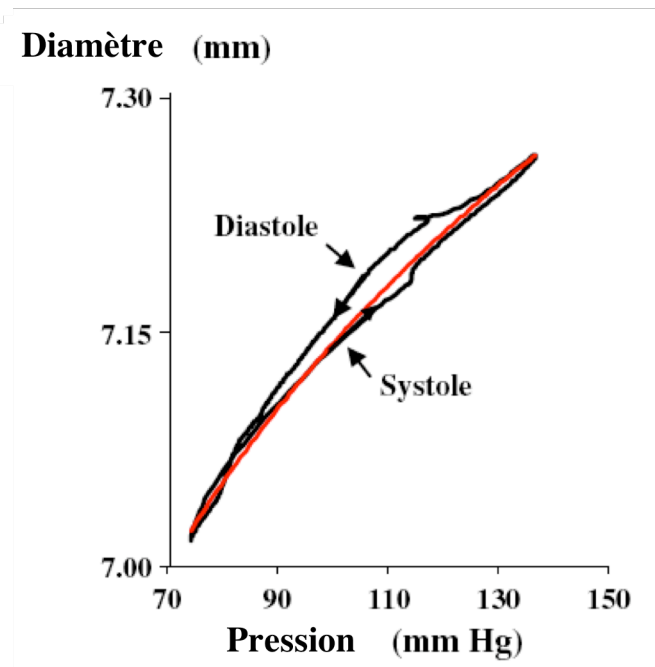


Figure 2: Courbe pression-diamètre de l'artère carotide commune.

Cette courbe démontre l'hystérèse anti-horaire de la relation pression-diamètre due à la dissipation de l'énergie par les propriétés visqueuses des artères de gros calibre. Adapté de ⁵.

L'élasticité non-linéaire de la paroi vasculaire est la plus importante propriété mécanique des gros troncs artériels. Cette non-linéarité de la relation pression-déformation s'explique par les différents éléments structuraux qui composent les vaisseaux. Selon la pression appliquée, différentes fibres sont sollicitées pour contrer l'augmentation de la pression⁸. À basse pression, c'est l'élastine qui joue ce rôle, alors que pour des pressions élevées, c'est le collagène qui est sollicité (Figure 3).

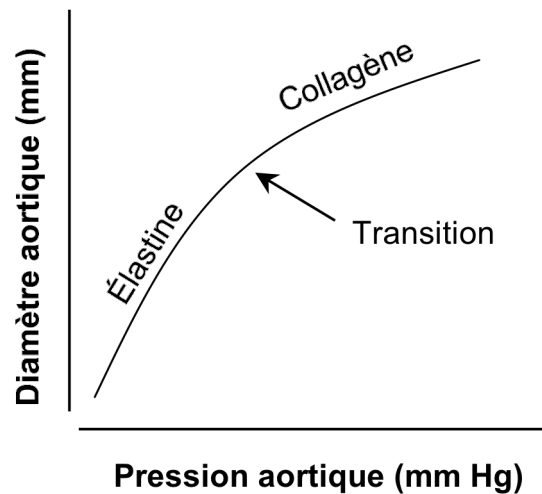


Figure 3: Transition de la contribution de l'élastine au collagène dans une aorte humaine.

Adapté de ⁸.

La lacune du modèle *Windkessel* à deux éléments est qu'en systole, la relation entre la pression et le débit sanguin ne peut être prédite adéquatement. Cette lacune a mené au développement d'un modèle à trois éléments. Dans ce modèle, l'impédance caractéristique (Z_0) s'ajoute à la résistance vasculaire et à la compliance pour constituer les trois éléments importants servant à caractériser le système artériel⁴. Z_0 représente l'impédance en absence de réflexion de l'onde de pression et corrèle directement avec les propriétés élastiques du lit artériel. Elle peut être estimée par l'équation:

$$Z_0 = \frac{\Delta P}{\Delta v}$$

où ΔP représente la variation de pression, et Δv la variation de la vitesse du flot sanguin¹³. La notion d'impédance est importante puisqu'elle prend en considération le caractère oscillatoire du flot sanguin et par conséquent, le déphasage entre le débit sanguin et la pression dans les vaisseaux. Ce concept est décrit plus en détails à la section 1.1.3. Les ondes de débit et de pression doivent être décomposées par des transformations de Fourier en une somme d'ondes sinusoïdales élémentaires d'amplitude différente dont la fréquence fondamentale est celle du cœur¹⁴.

1.1.2. Ondes de pression

L'éjection du sang par le ventricule gauche provoque une onde de pression le long de l'arbre vasculaire. Les différentes oppositions à cette onde de pression vont influencer sa forme. À mesure que l'onde de pression incidente voyage le long de l'aorte ascendante vers la périphérie, elle rencontrera sur son parcours des vaisseaux aux propriétés élastiques différentes, c'est-à-dire de moins en moins élastiques. Les artères auront également un diamètre de plus en plus petit. Ces deux facteurs contribuent à l'augmentation de la vitesse de l'onde de pression, ou vitesse de l'onde de pouls (VOP), le long de l'arbre artériel¹⁴. La relation s'exprime par l'équation¹⁵:

$$VOP = (E \cdot e / D \cdot \rho)^{1/2}$$

où E représente le module de Young, e l'épaisseur de la paroi vasculaire, D le diamètre du vaisseau et ρ la densité du sang. Ainsi, lorsque le module de Young est élevé, c'est-à-dire lorsque le vaisseau se déforme peu suite à l'application d'une contrainte donnée et donc qu'il est rigide, la vitesse de propagation de l'onde augmente, et il en est de même lorsque le diamètre du vaisseau diminue. Les pertes visqueuses le long de la paroi vasculaire vont quant à elles contribuer à amortir l'onde de pression en dissipant l'énergie dans la paroi artérielle¹⁶.

Les différentes ramifications le long de l'arbre artériel agissent comme points de réflexion de l'onde incidente. Il est suggéré que les artéριοles représenteraient le principal site de réflexion¹⁷. Ces points de réflexion jouent un rôle majeur dans la modification de la forme de l'onde de pression, puisque l'onde réfléchie va venir se superposer à l'onde incidente et ainsi modifier la forme de l'onde résultante.

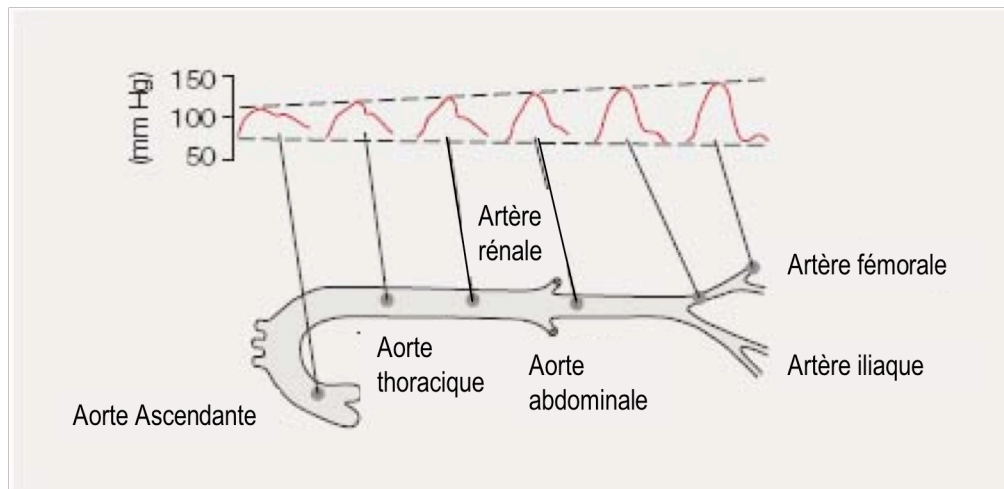


Figure 4: Amplification de l'onde de pression le long de l'arbre vasculaire.

Adapté de ⁸.

L'amplitude et la forme de l'onde de pression sont donc toutes deux dépendantes des variations dans la rigidité et le diamètre des vaisseaux selon l'éloignement par rapport au cœur, ainsi que des sites de réflexion provoqués par les différents embranchements le long de l'arbre artériel. Il en résulte que l'amplitude de l'onde augmente en fonction de l'éloignement par rapport au cœur (Figure 4), alors que la pression moyenne ne diminue que faiblement⁸. Cette amplitude représente la pression pulsée, soit la différence entre les pressions systolique et diastolique. Après l'augmentation rapide de la pression au niveau de l'aorte suite à l'éjection ventriculaire, une incisure se produit dans le pourtour de l'onde de pression (Figure 5). Cette incisure est la conséquence de la fermeture de la valve aortique. Après la fermeture de la valve, la pression remonte à nouveau, ce qui correspond à l'onde diastolique. Cette onde diastolique est le résultat de la réflexion de l'onde incidente en périphérie, avec un délai justifié

par la distance à parcourir pour que l'onde de pression retourne jusqu'aux gros vaisseaux. En se superposant à l'onde incidence, cette onde réfléchie permet de maintenir une pression suffisante pour perfuser les coronaires même durant la diastole⁵. L'incisure s'atténue également avec l'éloignement du cœur, pour finalement disparaître complètement au niveau de l'artère fémorale (Figure 5).

Les vaisseaux périphériques étant plus rigides et ayant un diamètre plus petit, la pression y est plus élevée et par conséquent, l'amplitude de l'onde réfléchie sera plus grande. D'autre part, dans le cas des vaisseaux en périphérie, l'onde incidente est réfléchie dès l'impact sur un site de réflexion et n'a ainsi que peu de distance à parcourir pour s'additionner à l'onde incidente⁵. Les deux ondes sont alors en phase et l'amplitude de l'onde résultante est ainsi pratiquement doublée (Figure 5).

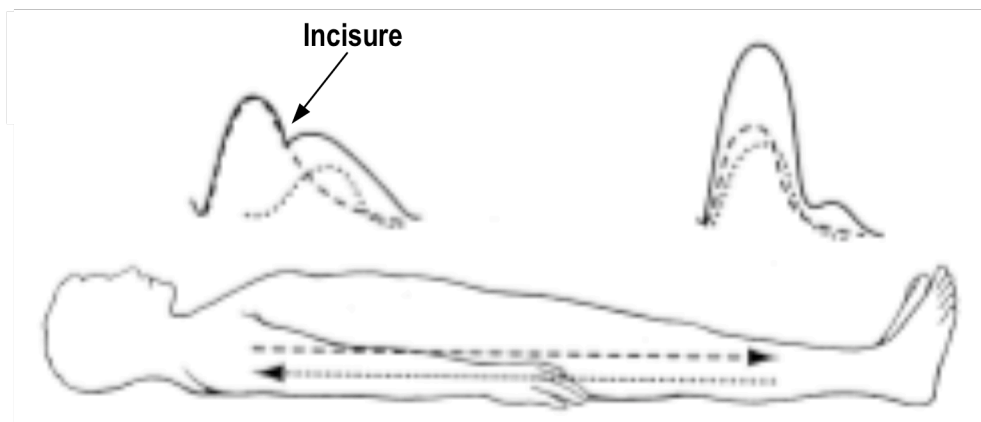


Figure 5: Tracés des parcours des ondes de pression.

Onde incidente (- - -) et onde réfléchie (•••), ainsi que leur superposition (-), près du cœur et en périphérie. Adapté de ⁸.

Le rythme cardiaque peut également jouer un rôle dans la forme de l'onde de pression, puisque pour une durée d'éjection plus longue, le pic systolique sera prolongé au niveau de l'aorte¹⁸. Par conséquent, l'onde réfléchie sera additionnée directement, sans qu'il n'y ait de

délat. Le contour de l'onde de pression sera alors davantage similaire à celui observé en périphérie.

1.1.3. Ondes de débit

Alors que l'amplitude de l'onde de pression augmente, l'amplitude des oscillations de l'onde de débit, quant à elles, s'amointrissent grandement en s'éloignant du cœur (Figure 6). Durant le premier tiers de l'éjection ventriculaire, soit dès l'ouverture de la valve aortique, le débit sanguin augmente rapidement dans l'aorte ascendante pour se chiffrer à environ 100 cm/s. À la fermeture de la valve aortique, il y a un flux rétrograde de sang, indiqué par le débit négatif sur la Figure 6. Puis, le débit tend vers zéro puisqu'il n'y a pas de débit additionnel durant la diastole. Un volume de sang d'en moyenne 80 mL est expulsé à une vitesse moyenne de 70 cm/s durant la période d'éjection, qui elle dure environ 0.25 seconde. Ce débit pulsatile s'atténue le long de l'arbre vasculaire, pour devenir pratiquement continu au niveau des artérioles.

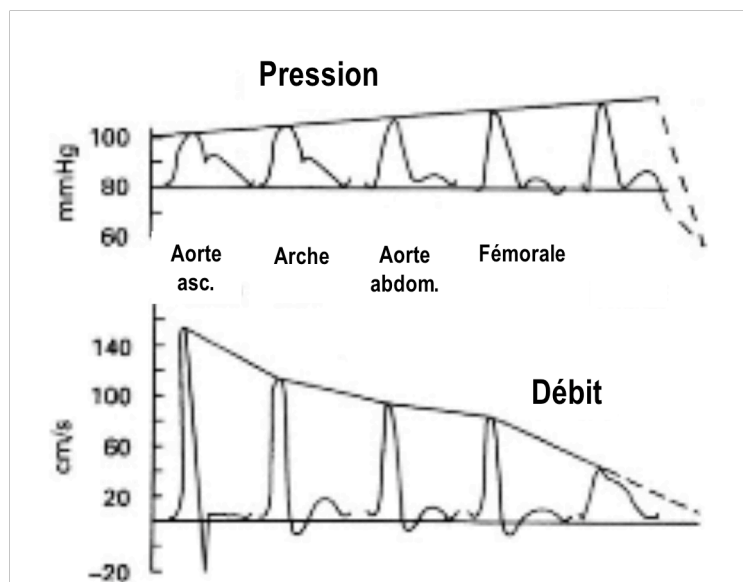


Figure 6: Comparaison des ondes de pression et de débit enregistrées à cinq sites physiologiques chez le chien.

Adapté de ⁸.

Le ratio des oscillations des ondes de pression sur celles des ondes du débit se nomme l'impédance, et représente l'opposition au flot sanguin pulsatile. Le concept analogue dans le cas d'un flot continu serait la résistance artérielle. Ainsi, d'après la Figure 6, l'impédance augmente en périphérie du cœur¹⁹.

1.2. Relation structure-fonction des artères de conductance

Les propriétés fonctionnelles des artères de conductance telle que l'aorte sont attribuables aux différents éléments qui composent la structure de ce type de vaisseaux. Ces principaux éléments sont l'élastine, le collagène et les CMLV²⁰. L'abondance relative de chacun de ces éléments dans un type de vaisseau en particulier lui confèrera des propriétés uniques. Par exemple, un vaisseau composé uniquement de collagène serait extrêmement rigide, alors qu'à l'inverse un vaisseau composé uniquement d'élastine serait très élastique (Figure 7). Cette rigidité matérielle va évidemment influencer la rigidité fonctionnelle (Figure 8). Dans les sections suivantes, ces éléments seront étudiés dans le contexte de leur organisation structurale.

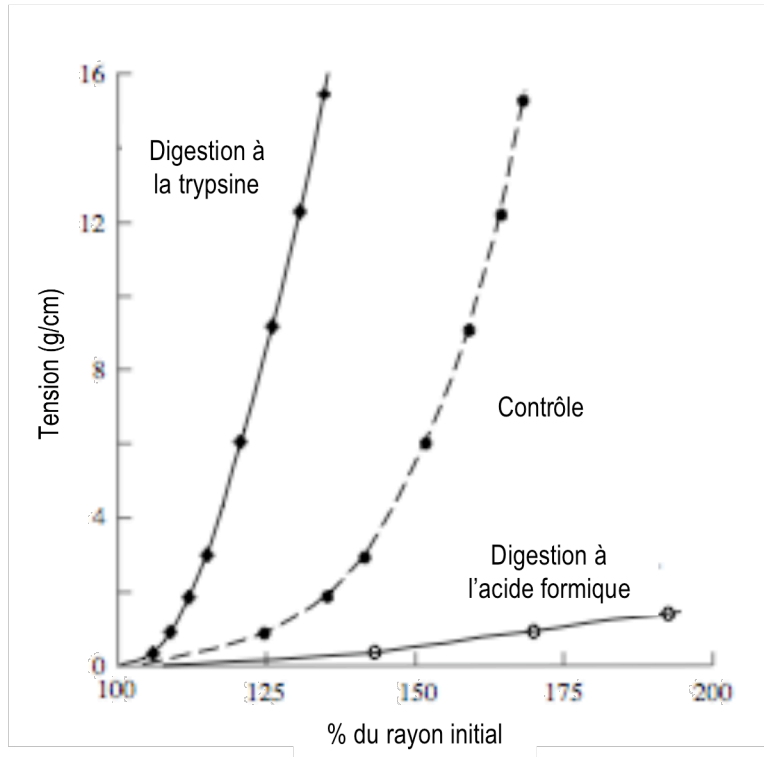


Figure 7: Impact de l'absence de collagène ou d'élastine dans la composition d'un vaisseau sur la tension développée lors de l'étirement.

Les vaisseaux digérés à la trypsine ne contiennent pas d'élastine, alors que ceux digérés à l'acide formique ne contiennent pas de collagène. Adapté de ²¹.

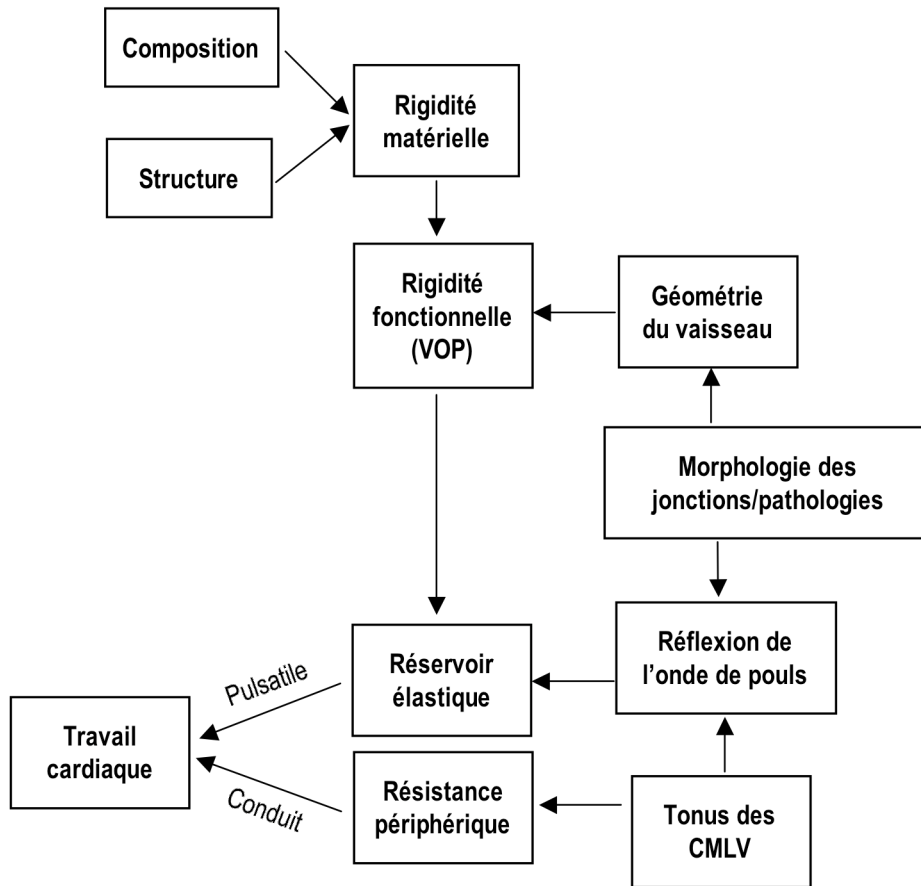


Figure 8: Lien entre les différents éléments impliqués dans la relation structure-fonction des vaisseaux de conductance.

VOP: vitesse de l'onde de pouls. Adapté de ²².

1.2.1. Tunica Intima

L'intima est la couche exposée à la lumière du vaisseau et par conséquent, au flot sanguin. Elle est bordée par une monocouche de cellules endothéliales reposant sur la lamelle élastique interne (LEI). Cette monocouche de cellules endothéliales forme l'endothélium, un exemple typique d'épithélium simple squameux. Entre l'endothélium et la LEI se trouve la couche subendothéliale, dont l'épaisseur varie selon l'âge et l'état pathologique. Par contre, cette couche est pratiquement inexistante dans les artères musculaires. Les cellules endothéliales jouent des rôles biologiques importants comme le contrôle du tonus vasculaire

par la production des facteurs vasoactifs²³, les échanges entre le sang et les tissus adjacents grâce à la semi-perméabilité de l'endothélium, la participation à l'angiogénèse par la sécrétion de facteurs de croissance tels que le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), le *fibroblast growth factor* (FGF) et le *platelet derived growth factor* (PDGF)²⁴, et empêchent l'agrégation plaquettaire²⁵. De plus, les cellules endothéliales participeraient à la production d'élastine et contribueraient ainsi à la formation de la LEI²⁰. Chez les individus sains, la contribution de l'intima aux propriétés mécaniques des vaisseaux de conductance ne serait pas significative²⁰.

1.2.2. Tunica Media

La média est délimitée du côté luminal par la LEI et du côté adventitial par la lamelle élastique externe (LEE). Entre ces deux lamelles se trouve un réseau tridimensionnel de CMLV et de constituants de la matrice extracellulaire (MEC), principalement l'élastine et le collagène (Figure 9). L'élastine et le collagène constituent l'échafaudage fibreux de la matrice, alors que les protéoglycanes et les glycoprotéines de structure comme la fibronectine et les fibrillines remplissent les interstices entre les CMLV et la MEC²⁶ (Figure 10). Ensemble, les lamelles élastiques et les faisceaux de collagène forment le squelette de la média²⁷. Les CMLV sont une composante active du vaisseau de par leur capacité à se contracter, alors que l'élastine et le collagène sont des composantes passives¹⁶. L'association étroite de ces trois composantes confère aux vaisseaux leurs propriétés viscoélastiques et par conséquent, les fonctions mécaniques statique et dynamique qui leur sont associées²⁰. Dans le cas de l'aorte, l'élastine est la composante principale de la MEC, pouvant représenter jusqu'à 50% du poids sec du vaisseau^{28,29}, contre environ 20% pour les CMLV³⁰.

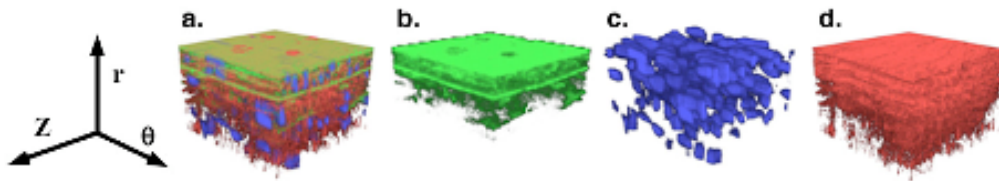


Figure 9: Disposition spatiale des cellules de muscle lisse, de l'élastine et du collagène dans la tunica media.

Le vert (b.) représente l'élastine, le bleu (c.) les noyaux de CMLV et le rouge (d.) le collagène. a. représente l'image composite. Le r indique la direction radiale (vers la lumière du vaisseau), le Z indique la direction axiale et le θ indique la direction circonférentielle. Adapté de ³¹.

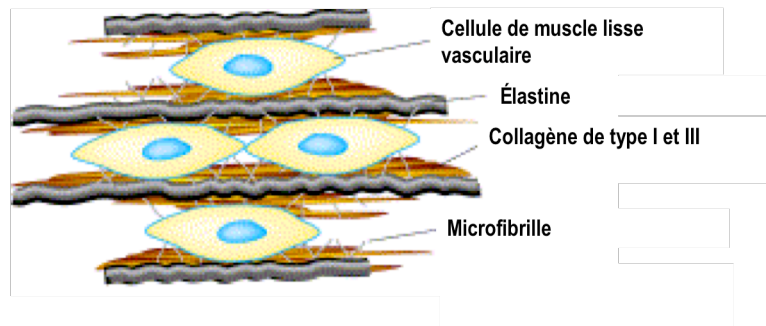


Figure 10: Composition d'une coupe transversale d'un vaisseau de conductance.

Adapté de ³².

1.2.2.1. L'élastine

L'élastine confère aux vaisseaux leurs propriétés élastiques. L'élastine possède un module élastique de 1 MPa, ce qui est comparable à celui d'un élastique commun³³. L'élastine est l'une des premières protéines de structure à être exprimée par les CMLV dans les gros vaisseaux²⁰. Les fibres élastiques sont des structures complexes composées en majeure partie d'élastine et, en moindre proportion, de microfibrilles, elles-mêmes composées de larges glycoprotéines, les fibrilines³⁴. Dans les fibres élastiques matures, l'élastine compte pour 90% du volume au niveau du cœur de cette fibre alors que les microfibrilles de fibriline en forment la couverture³⁵. Les microfibrilles procurent une structure générale à la lamelle élastique³⁶.

Alors que le rôle principal des fibres élastiques est d'assurer l'élasticité des gros vaisseaux, les microfibrilles de fibriline quant à elles joueraient un rôle dans l'élastogénèse, la transmission des signaux cellulaires et maintiendraient également l'homéostasie tissulaire par la séquestration de *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β)³⁵. Il a aussi été démontré que l'élastine était impliquée dans la transmission de signaux cellulaires, par exemple en modulant la prolifération des CMLV par son interaction avec le récepteur élastine-laminine³⁷ et en influençant le phénotype des CMLV³⁸.

Chez l'humain et chez toutes les espèces à l'exception de la grenouille et du poisson zébré, un seul gène code pour l'élastine. Ce gène code pour la tropoélastine, une protéine de 60-70 kDa. La tropoélastine est le précurseur soluble de l'élastine. Ce monomère est synthétisé par les CMLV, et l'élastine est le résultat de la réticulation covalente des monomères de tropoélastine. Ces modifications *post*-translationnelles permettent à la tropoélastine de devenir le polymère fonctionnel qu'est l'élastine, qui elle est insoluble²⁰. Le caractère hydrophobe de l'élastine serait un facteur déterminant dans ses caractéristiques élastiques. Les fibres élastiques forment des lamelles élastiques organisées en cercles concentriques dans la média. L'épaisseur de ces lamelles est relativement constante à travers la média²⁷. Entre ces lamelles élastiques se trouvent les CMLV, le collagène et des composantes de la MEC riches en protéoglycanes. L'unité lamellaire, c'est-à-dire deux lamelles élastiques concentriques adjacentes et le tissu intermédiaire s'y rattachant, est l'unité structurelle de la média, dans laquelle l'organisation des CMLV, de l'élastine, et du collagène qu'elle contient permet le fonctionnement de la média en tant que système à deux phases³⁰. Ce système implique qu'à des pressions artérielles élevées, les fibres de collagène alignées circonférentiellement supportent la majeure partie de la force imposée sur la paroi vasculaire. À des pressions plus faibles, l'élastine absorbe cette force et l'emmagasine tel un réservoir³⁴ alors que moins de 10% du collagène est impliqué³⁹. Tel que mentionné précédemment, ces contributions distinctes expliquent qu'à pression élevée, les artères deviennent plus rigides puisque les fibres de collagène, qui ont un module élastique près de 1 000 fois supérieur à celui de l'élastine^{7,29}, sont recrutées pour limiter la distension aortique.

Au cours de la formation de la paroi vasculaire des gros vaisseaux, l'augmentation progressive de la tension sur la paroi vasculaire permet la coordination de la différenciation des CMLV et l'augmentation du nombre de lamelles élastiques ainsi que du contenu en élastine pour arriver aux conditions optimales permettant de résister à la pression^{40,41}. Dans l'aorte, la synthèse de l'élastine décroît rapidement après la naissance alors que la pression se stabilise, et une synthèse minimale se poursuit chez l'adulte. D'ailleurs, le nombre d'unités lamellaires dans un vaisseau ne changerait pas après la naissance²⁰. La réparation des bris d'élastine chez l'adulte est incomplète, mais ce fait est moindrement compensé par la longue demi-vie de l'élastine⁴².

La production de MEC capable de se distendre et d'absorber le flot pulsatile du cœur est considérée comme une étape critique de l'évolution des organismes supérieurs³⁴. Le nombre d'unités lamellaires serait directement proportionnel à la tension dans ce vaisseau: ce nombre est donc le plus élevé dans les gros vaisseaux puis diminue le long de l'arbre artériel vers la périphérie pour atteindre un minimum au niveau des artères musculaires⁴³. De plus, le nombre d'unités lamellaires aortiques serait directement proportionnel au rayon de l'aorte, peu importe l'espèce ou l'aire de section aortique³⁰. Par contre, l'aorte humaine ferait exception et contiendrait moins de lamelles élastiques que ne le prédit son rayon, ce qui la rendrait plus susceptible aux altérations pathologiques^{44,45}. L'objectif de cette proportionnalité est de maintenir une tension par unité lamellaire pratiquement constante parmi les espèces, allant de 1 090 à 3010 dynes/cm. Ces informations supportent le concept que la structure de l'unité lamellaire est reliée à la régulation de la tension médiale et par conséquent est impliquée dans les propriétés mécaniques³⁰.

En plus de sa présence au niveau des fibres élastiques composant les lamelles concentriques, l'élastine forme aussi un réseau entre ces lamelles. Il est alors question d'élastine interlamellaire et d'épais embranchements radiaux d'élastine. L'existence de ces embranchements s'expliquerait par la nécessité à contenir la pression localement³¹. Chez l'humain, ce réseau interlamellaire d'élastine serait plus irrégulier que ce qui est observé chez la souris²⁷. Il occuperait en effet la majorité de l'espace interlamellaire²⁷. De plus, ce réseau d'élastine enveloppe les CMLV, constituant ainsi le principal contact entre l'élastine et les

CMLV²⁷. Ainsi, le cytoplasme des CMLV servirait de point d'appui pour l'élastine interlamellaire, permettant à l'élastine de transférer le stress lamellaire aux CMLV. Les embranchements radiaux permettraient quant à eux de supporter la pression radiale et de prévenir la dissection ou la délamination aortique. Les CMLV sont elles aussi alignées circonférentiellement et, dans l'aorte du rat, le noyau forme un angle d'environ 20° par rapport au rayon, alors que le cytoplasme a une forme plus irrégulière. Cet alignement des différents constituants de façon circonférentielle et donc dans la même direction que la pression physiologique dominante suggère une forte corrélation entre les fonctions mécaniques des vaisseaux et leur structure³¹.

1.2.2.2. Les cellules de muscle lisse vasculaire

Dans les gros vaisseaux, les CMLV apportent une contribution mineure aux propriétés mécaniques statiques³⁴, ce qui constitue une distinction par rapport à leur rôle dans les artères musculaires et de résistance. Leur rôle principal serait plutôt de synthétiser et d'organiser la formation de la MEC dans le but de former un vaisseau aux propriétés mécaniques particulières, c'est-à-dire une paroi vasculaire hautement résiliente, pour laquelle peu d'énergie est perdue lors du retour à la forme initiale, et dont l'élasticité non-linéaire protège contre la rupture à haute pression³⁴. D'ailleurs, il a été suggéré que la différenciation des CMLV pourrait être plus adéquatement décrite par le patron d'expression des protéines de la MEC plutôt que par la présence ou l'absence de marqueurs intracellulaires⁴⁶. Le module élastique incrémental de l'aorte pour toutes les espèces converge vers des valeurs se situant entre 0.3 à 1.0 MPa lorsque normalisé par rapport à la pression artérielle⁴⁷. Cet éventail de valeurs représenterait la cible à atteindre pour obtenir les propriétés mécaniques optimales de l'aorte, et l'atteinte et le maintien de cette cible constituerait un modulateur de l'expression génique des composantes de la matrice extracellulaire dans la paroi vasculaire²⁰.

Les CMLV contribuent à l'aspect visqueux des propriétés viscoélastiques des gros vaisseaux, grâce à leur plasticité²⁹. Cette propriété des CMLV fait en sorte qu'il n'y a pas d'énergie perdue lorsque les CMLV participent à la tension de maintenance. Les CMLV ont

une très faible résistance à l'étirement et, qu'elles soient contractées ou non, ne contribueraient que de façon négligeable à la tension élastique dans la paroi vasculaire. Le noyau des CMLV est de forme elliptique, suggérant une tension constante au niveau de la cellule. D'ailleurs, le cytoplasme est composé d'une matrice cytosquelettique qui transmettrait les forces externes au noyau, ce qui pourrait même aller jusqu'à influencer la transcription génique, et ainsi avoir un impact sur la synthèse de MEC et la production de métalloprotéinases matricielles (MMP).

1.2.2.3. Le collagène

Les fibres de collagène comptent pour 20 à 40% du poids sec des parois vasculaires. Les collagènes fibrillaires de type I et III sont ceux présents en majorité dans les artères avec une proportion respective de 60% et 30% comparativement à l'ensemble des collagènes vasculaires³⁸. Le collagène de type V est présent dans une plus faible proportion mais possède tout de même le rôle essentiel de déterminer le diamètre des fibres de collagène I auxquelles il est associé⁴⁸. Ces fibres de collagène occupent l'espace entre les fibres élastiques et les CMLV, en se concentrant de part et d'autre des lamelles élastiques⁴⁹. Les fibres de collagène procurent une force de résistance mécanique au vaisseau. Tout comme les fibres élastiques interlamellaires et les noyaux des CMLV, les faisceaux de fibres de collagène sont orientés circonférentiellement, mais n'auraient toutefois pas d'inclinaison radiale. Par conséquent, il est suggéré que les fibres de collagène seraient indépendantes de l'élastine et des CMLV, mais qu'elles recevrait plutôt l'information globalement d'après l'unité lamélaire³¹. Le collagène adventiciel quant à lui serait distribué de façon aléatoire.

1.2.3. Tunica Adventitia

L'adventice est la couche externe du vaisseau, séparée de la média par la LEE. Elle est particulièrement riche en fibres de collagène, et contient divers éléments comme de l'élastine, du tissu adipeux, des fibroblastes, des macrophages, les *vasa vasorum* et des terminaisons nerveuses. Les fibres de collagène composant l'adventice n'ont pas d'orientation préférentielle

et ne sont pas étirées à pression physiologique, contrairement à ce qui est observé dans la média. Les propriétés mécaniques de l'adventice dépendent de l'organisation des fibres de collagène, c'est-à-dire de leur ondulation et de leur dispersion angulaire⁵⁰. L'adventice était autrefois considérée comme une structure passive, mais diverses études récentes suggèrent une implication possible dans la régulation des fonctions mécaniques des vaisseaux en influençant le tonus des CMLV. La contribution réelle de l'adventice aux propriétés viscoélastiques des vaisseaux reste à déterminer⁵¹.

1.3. Vieillesse vasculaire

1.3.1. Augmentation de la rigidité artérielle

La rigidité artérielle reflète les dommages au sein de la paroi vasculaire. Il a même été suggéré qu'elle pourrait être considérée comme un biomarqueur tissulaire⁵². L'augmentation de la rigidité vasculaire provoque une augmentation de la VOP le long de l'arbre artériel. De 20 à 80 ans, la VOP passe d'environ 2 m/secondes à 12 m/seconde au niveau de l'arche aortique⁵³ (Figure 11).

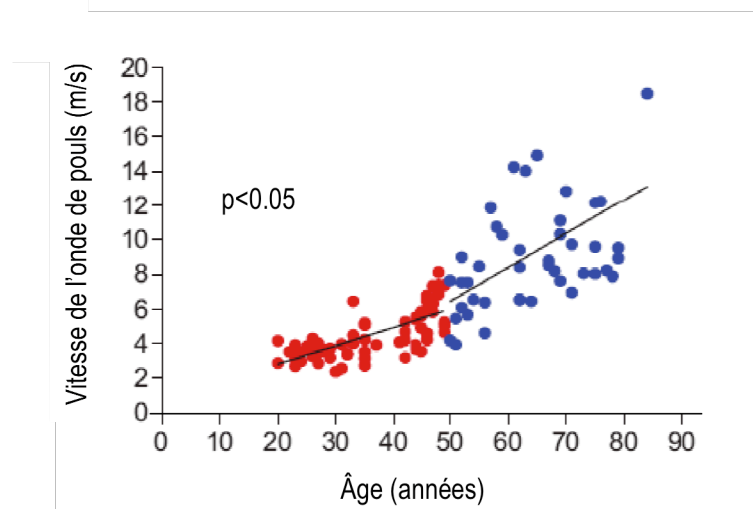


Figure 11: Évolution de la VOP selon l'âge.

Adapté de ⁵³.

L'impact de cette augmentation se traduit par le retour précoce de l'onde de pression incidente (Figure 12). Ce retour précoce fait en sorte qu'au lieu de retourner au cœur lors de la fin de l'éjection ventriculaire pour contribuer à la pression diastolique, le retour de l'onde de pression s'effectue durant et même avant le pic maximal de l'éjection ventriculaire. Ceci provoque une augmentation de la pression systolique avec présence d'un pic secondaire peu de temps après le pic initial, et par le fait même, une diminution de la pression diastolique.

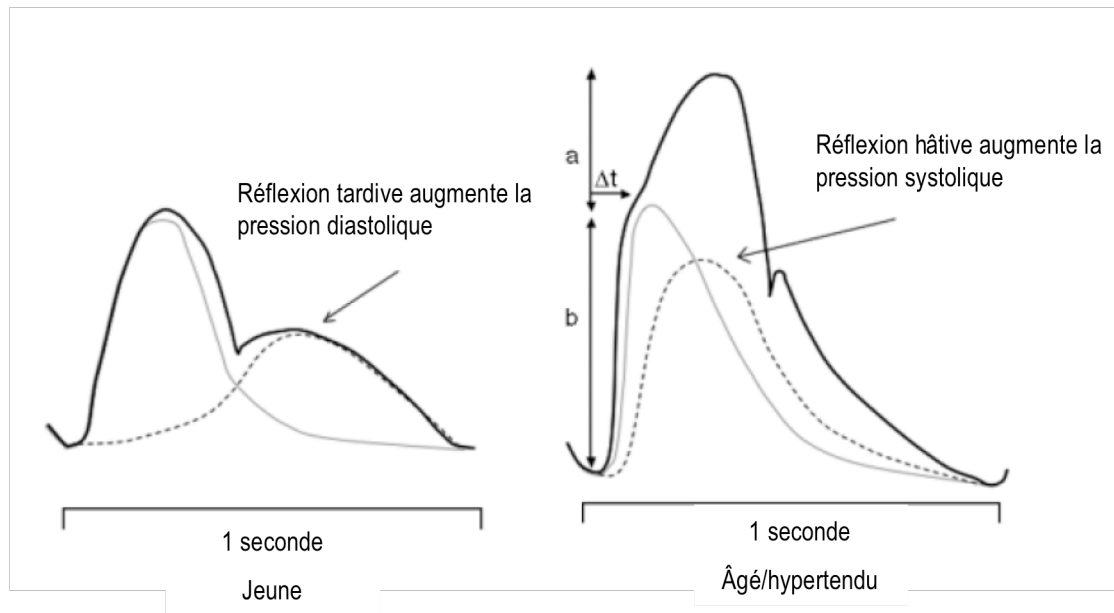


Figure 12: Retour précoce de l'onde de pression.

La réflexion de l'onde de pression (ligne pointillée), se superpose à l'onde de pression incidente (ligne grise) chez le sujet âgé ou hypertendu. La ligne noire représente la sommation de l'onde incidente et de l'onde réfléchie. Adapté de ⁵⁴.

Cette pression systolique supplémentaire attribuable au retour précoce de l'onde de réflexion se définit par l'index d'augmentation (IA), et est détaillée par l'équation suivante (Figure 13):

$$IA = \frac{Ps - Pd}{PP} \times 100\%$$

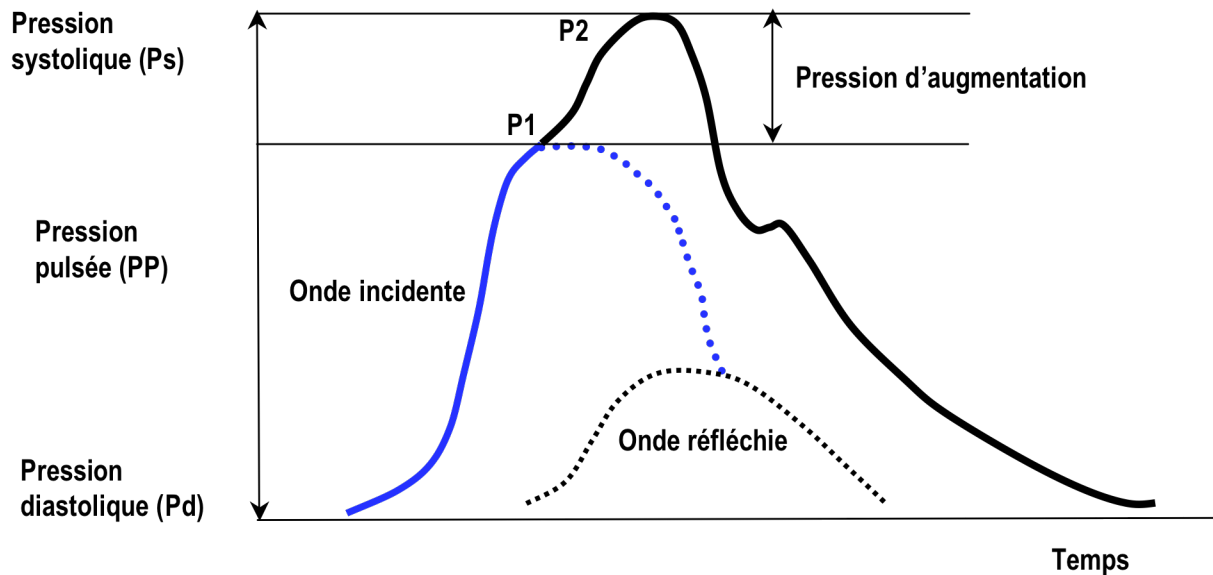


Figure 13: Mesure de l'index d'augmentation de la pression.

Adapté de ⁵⁵.

L'augmentation de la rigidité vasculaire augmente aussi l'impédance caractéristique. Par exemple, pour un sujet de 20 ans, l'augmentation de la pression au niveau de l'aorte proximale est d'environ 20 mmHg lors de l'éjection ventriculaire. Chez un sujet âgé, cette pression peut s'élever jusqu'à 40 mmHg, ce qui se traduit par une augmentation de la pression systolique⁸.

Le résultat de ces deux modifications fonctionnelles est que la pression pulsée est pratiquement triplée chez le sujet de 80 ans comparativement à celle d'un sujet de 20 ans, passant d'environ 20 mmHg à 60 mmHg. L'augmentation de la pression pulsée est caractéristique de l'hypertension systolique isolée (HSI).

1.3.1.1. Indices de rigidité artérielle

En clinique, la rigidité artérielle s'évalue à l'aide de différents indices. Ces indices rendent compte soit de la rigidité régionale, locale ou encore systémique selon la méthodologie utilisée^{55,56}. Il est par contre établi que la rigidité artérielle systémique ne peut constituer qu'une estimation de la rigidité.

Indice	Definition	Formule	Unités
Distensibilité artérielle	Changement relatif de diamètre (ou d'aire) pour un incrément donné de pression	$\Delta D/\Delta P \times D$	mmHg ⁻¹
Compliance artérielle	Changement absolu de diamètre (ou d'aire) pour un incrément de pression donné	$\Delta D/\Delta P$	cm/mmHg
Module élastique	Pression requise pour un étirement théorique de 100% de son diamètre au repos du vaisseau	$\Delta P \times D/\Delta D$	mmHg
Module de young (E)	Pression par unité de surface requise pour un étirement théorique de 100% du diamètre au repos du vaisseau	$\Delta P \times D/(\Delta D \times h)$	mmHg/cm
Indice de rigidité (β)	Ratio du logarithme [pression systolique/pression diastolique] sur le changement relatif du diamètre	$\ln (P_s/P_d)/[(D_s-D_d)/D_d]$	–
Vitesse de l'onde de pouls	Temps requis pour une onde de pression pour voyager sur une distance donnée le long de l'arbre artériel	Distance/ Δt	cm/s
Pression pulsée	Différence entre la pression systolique et la pression diastolique	$P_s - P_d$	mmHg
Index d'augmentation	Proportion de la pression pulsée attribuable au retour précoce de l'onde de réflexion	$(\Delta P/PP) \times 100$	%

Tableau I: Définition des différents indices utilisés pour caractériser la rigidité artérielle.

Les indices locaux de rigidité artérielle sont la distensibilité, la compliance, le module élastique, le module de Young et l'indice de rigidité β . Ces indices locaux s'obtiennent généralement à l'aide d'ultrasons sur des artères superficielles comme les carotides. Ces

méthodes ont l'avantage d'évaluer directement l'impact du changement de pression sur le changement de volume. Leur utilisation est indiquée pour des analyses mécanistiques en pathophysiologie, mais ces mesures sont moins fréquemment utilisées pour les études épidémiologiques⁵⁵.

La mesure de la VOP le long de l'arbre aortique est quant à elle la méthode de référence pour évaluer la rigidité régionale due à sa simplicité, sa robustesse et sa reproductibilité⁵⁵. C'est aussi la méthode la plus pertinente à utiliser en clinique, puisque la rigidité de l'aorte est responsable de la majorité des effets délétères de la rigidité artérielle⁵⁵. La mesure de la VOP carotido-fémorale est d'ailleurs la mesure qui a la meilleure valeur prédictive dans les études épidémiologiques. La VOP peut être calculée en mesurant le temps de transit d'une onde de pression entre deux extrémités d'un segment artériel d'une distance connue, à l'aide de capteurs de pression ou de sondes Doppler. Le pied de l'onde de pouls, à la fin de la diastole, est utilisé comme point de référence pour mesurer la distance entre les deux ondes (Figure 14).

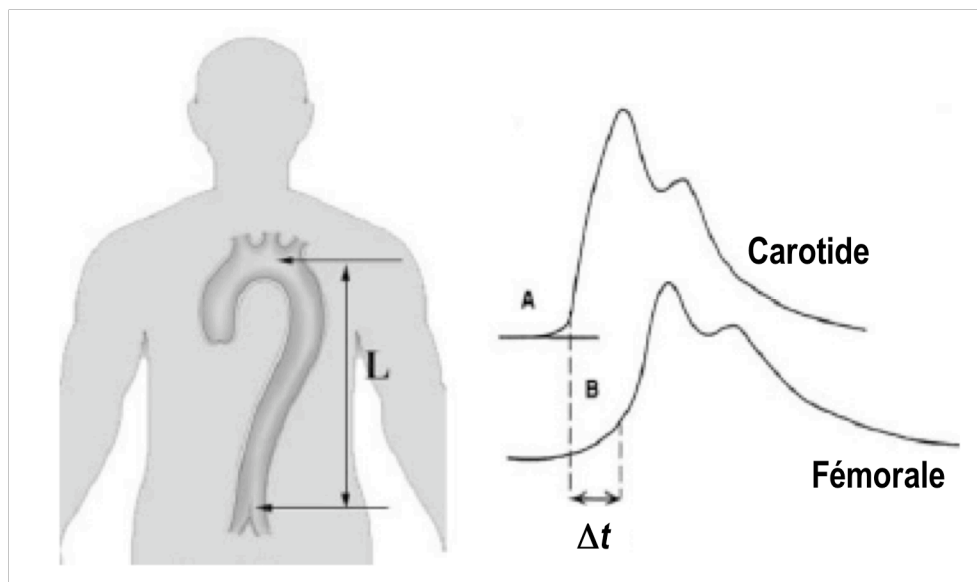


Figure 14: Mesure de la VOP.

Le L représente la longueur du segment artériel, et le Δt représente le décalage, en unité de temps, entre les deux ondes de pression. Adapté de ⁵⁶.

Les tracés des ondes de pression obtenus au niveau de l'aorte ascendante permettent aussi de mesurer l'index d'augmentation, tel que décrit antérieurement lors de l'illustration du concept de retour précoce de l'onde de réflexion. C'est une mesure non-invasive qui s'obtient en calculant la différence entre le premier et le second pic systolique exprimée en pourcentage de la pression pulsée. La tonométrie de l'artère radiale peut être utilisée pour obtenir les tracés des ondes de pression.

Finalement, la mesure de la rigidité artérielle systémique est obtenue par l'application de modèles de circulation sanguine⁵⁷, en utilisant par exemple des analogies avec des modèles électriques incorporant les notions de capacitance et de résistance⁵⁸. Ces analogies sont basées sur plusieurs approximations, ce qui a pour effet de diminuer la valeur prédictive de cette méthode et de limiter son application en clinique. La compliance artérielle systémique se définit alors à l'aide de la courbe de décroissance diastolique de l'onde de pression⁵⁹. Elle peut aussi être estimée par le ratio du volume d'éjection systolique et de la pression pulsée⁵⁹.

Étant donné le phénomène d'amplification des ondes de pression, mis en évidence par l'élargissement de la pression pulsée le long de l'arbre artériel, il faut distinguer les pressions systolique et pulsée enregistrées au niveau brachial (périphérique) de celles enregistrées au niveau carotidien (central), puisque les mesures brachiales ne rendent pas compte adéquatement de cette amplification et plus précisément dans le cas d'un sujet âgé, de sa diminution. Les mesures centrales sont évidemment les plus appropriées et plus spécifiques pour évaluer la rigidité artérielle⁶⁰. L'amplification de la pression pulsée est aussi un indice de la rigidité artérielle, puisque l'augmentation de la pression centrale est une manifestation de l'augmentation de la vitesse de propagation de l'onde de pouls et de son retour précoce¹³. Au lieu d'être exprimée en pourcentage de la pression pulsée comme le fait l'index d'augmentation, l'amplification est simplement définie par la valeur absolue de la différence entre le pic attribuable à la pression systolique et celui attribuable à la sommation de l'onde réfléchie⁶¹.

1.3.1.2. La rigidité artérielle comme facteur de risque cardiovasculaire

1.3.1.2.1. *Hypertension systolique isolée*

Auparavant, le risque cardiovasculaire relié à l'hypertension était typiquement défini en tenant compte de la pression artérielle moyenne (PAM) ou même encore de la pression diastolique uniquement. Ce risque était attribuable au remodelage vasculaire des petites artères et à leur raréfaction, ce qui a comme conséquence d'augmenter la résistance périphérique^{62,63}. Les études épidémiologiques ont alors clairement établi le lien entre l'augmentation de la pression artérielle et l'incidence de maladies cardiovasculaires⁶⁴. Une pression systolique élevée était interprétée comme reflétant un ventricule gauche puissant⁶⁵. Par contre, les résultats d'études épidémiologiques effectuées au cours des 15 dernières années suggèrent que le risque cardiovasculaire serait décrit de façon plus juste lorsque la pression systolique est prise en considération et donc par le fait même, la rigidité vasculaire⁶⁴. En fait, ces études permettent d'établir que la rigidité artérielle est un meilleur prédicteur du risque cardiovasculaire que la résistance vasculaire périphérique⁶⁵. De plus, certaines études ont démontré que le risque cardiovasculaire était associé non seulement à l'augmentation de la pression systolique, mais aussi à une diminution conjointe de la pression diastolique et donc à une augmentation de la pression pulsée⁶⁶. La pression pulsée est maintenant d'ailleurs considérée comme étant le meilleur prédicteur du risque cardiovasculaire dans la population âgée⁶⁶, normotendue⁶⁷ et hypertendue⁶⁸. La pression pulsée est aussi un prédicteur indépendant de la mortalité cardiovasculaire même chez des patients ayant souffert d'infarctus du myocarde, d'insuffisance cardiaque ou de dysfonction myocardique⁶⁴.

L'HSI se définit par une pression systolique ≥ 140 mmHg et une pression diastolique ≤ 90 mmHg. Près de 80% des personnes hypertendues âgées de plus de 60 ans présentent en fait une HSI⁶⁹. La mortalité cardiovasculaire est augmentée significativement chez les personnes dont la pression pulsée est plus élevée comparativement aux personnes chez qui l'augmentation de la systolique et de la diastolique est parallèle⁷⁰. Il est important de rappeler que cette valeur prédictive est valable même pour les individus normotendus⁶⁷. En général, les

traitements antihypertensifs diminuent la PAM sans toutefois diminuer la pression pulsée et par conséquent, le risque cardiovasculaire reste présent⁷¹. C'est pourquoi il est important de s'attarder sur la recherche de thérapies capables de moduler la pression systolique et la pression pulsée et les facteurs les influençant ces variables comme la rigidité artérielle.

De façon courante, la pression artérielle est mesurée au niveau de l'artère brachiale. Cette méthode est adéquate pour poser un diagnostic d'hypertension essentielle. Or, il est maintenant établi que la mesure de la pression aortique et donc de la pression artérielle centrale est plus appropriée pour rendre compte du risque cardiovasculaire⁷², pour les raisons décrites ci-haut. De plus, en raison de l'amplification des ondes de pression, la pression centrale est la seule mesure capable d'évaluer correctement la pression pulsée. Une personne pour qui cette amplification est faible est sujette à une *post*-charge ventriculaire plus élevée, cette faible amplification étant le reflet d'une pression centrale élevée⁶¹ et donc d'une rigidité artérielle centrale.

1.3.1.2.2. *Augmentation de la vitesse de l'onde de pouls*

La VOP reflète la rigidité artérielle centrale. Chez les patients souffrant d'hypertension artérielle essentielle, la VOP aortique est considérée comme étant un des meilleurs prédicteurs de la mortalité cardiovasculaire⁷³. Une étude effectuée auprès de la population générale âgée de 40 à 70 ans a conclu que la VOP aortique est aussi un prédicteur significatif de complications cardiovasculaires, au-delà des facteurs de risque conventionnels comme la PAM, l'âge, le sexe et l'indice de masse corporelle⁷⁴. Une association similaire a été également démontrée auprès d'une population normale mais légèrement plus âgée⁷⁵. La mesure de la VOP fémoro-carotidienne est la méthode de référence absolue pour évaluer la rigidité artérielle, plus efficace que la pression pulsée même, notamment en raison de l'ensemble des preuves démontrant son association avec la présence de maladies cardiovasculaires et ce, indépendamment des facteurs de risques traditionnels et dans des populations variées^{55,76}. La VOP est décrite par l'équation de Moens-Kortweg:

$$VOP = \sqrt{\frac{E_{inc.} \cdot h}{2r\rho}} = \sqrt{\frac{1}{\rho D}}$$

où $E_{inc.}$ représente le module élastique incrémental de la paroi vasculaire, h l'épaisseur de la média, r le rayon du vaisseau, ρ la densité du sang et D la distensibilité. Cette équation permet de constater l'influence de l'élasticité du vaisseau sur la VOP et par le fait même, la relation intrinsèque entre les propriétés mécaniques du vaisseau et la VOP. Par contre, il est important de garder en tête que la VOP est une mesure indirecte et reste un indice de rigidité artérielle, cette dernière ne pouvant être quantifiée directement.

1.3.1.3. Dommages aux organes-cibles

1.3.1.3.1. *Reins et cerveau*

La rigidité artérielle et la modification du parcours des ondes de pression qui en résulte ont un impact sur les lits vasculaires qui irriguent des organes à haut flux artériel comme les reins et le cerveau. Contrairement à la plupart des autres organes du corps, les vaisseaux des reins et du cerveau restent dilatés et offrent une résistance vasculaire faible puisqu'ils doivent être perfusés par un important volume de sang de façon continue. Ils ne sont ainsi pas protégés par la vasoconstriction des artères et artérioles en amont⁶⁰. Une association a été démontrée entre la rigidité artérielle et des complications microvasculaires, c'est-à-dire affectant les vaisseaux dont le diamètre est inférieur à 150 μm , telles que l'insuffisance rénale, la protéinurie et les accidents vasculaires cérébraux⁶⁰. Ces dommages microvasculaires seraient causés par le flot pulsatile atteignant ces petits vaisseaux et artérioles périphériques, une pulsation qui serait normalement atténuée si l'élasticité des vaisseaux de conductance et l'absorption de l'énergie pulsatile due à la viscosité des parois vasculaires n'étaient pas altérées⁷⁷. L'augmentation du stress circonférentiel pulsatile perturbe la monocouche de cellules endothéliales, causant des lésions qui augmentent le risque de thrombose, de micro-infarctus et même de micro-ruptures au niveau du vaisseau. Dans le cerveau, ces lésions se nomment les encéphalopathies de la pression pulsée^{78,79}.

1.3.1.3.2. *Cœur*

Le lien entre l'augmentation de la rigidité artérielle et la morbidité/mortalité associées aux problèmes cardiaques est bien établi^{67,80,81}. L'augmentation de la VOP est un prédicteur indépendant des maladies coronariennes et des accidents vasculaires cérébraux⁸⁰ (Figure 15). La rigidité aortique et par conséquent le retour précoce de l'onde de pression, et l'augmentation de Z_0 aortique sont associées au développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche, le cœur devant exercer une force supplémentaire pour fournir le même débit aux organes tout en expulsant le sang dans un vaisseau rigide, couplé à un temps d'éjection prolongé^{8,82}. Ces changements prédisposent à l'ischémie cardiaque puisque la demande en oxygène est augmentée, alors que l'apport est en fait diminué⁸²⁻⁸⁴. En effet, la diminution de la pression diastolique diminue la perfusion coronarienne⁸⁵. Le temps de systole est augmenté, et celui de la diastole, diminué. L'impact de la réduction de la durée de la diastole est majeur: une réduction de 55% à 45% du cycle cardiaque aurait le même effet qu'un rétrécissement coronarien de 40% à 90% sur l'induction de l'ischémie myocardique⁸⁶.

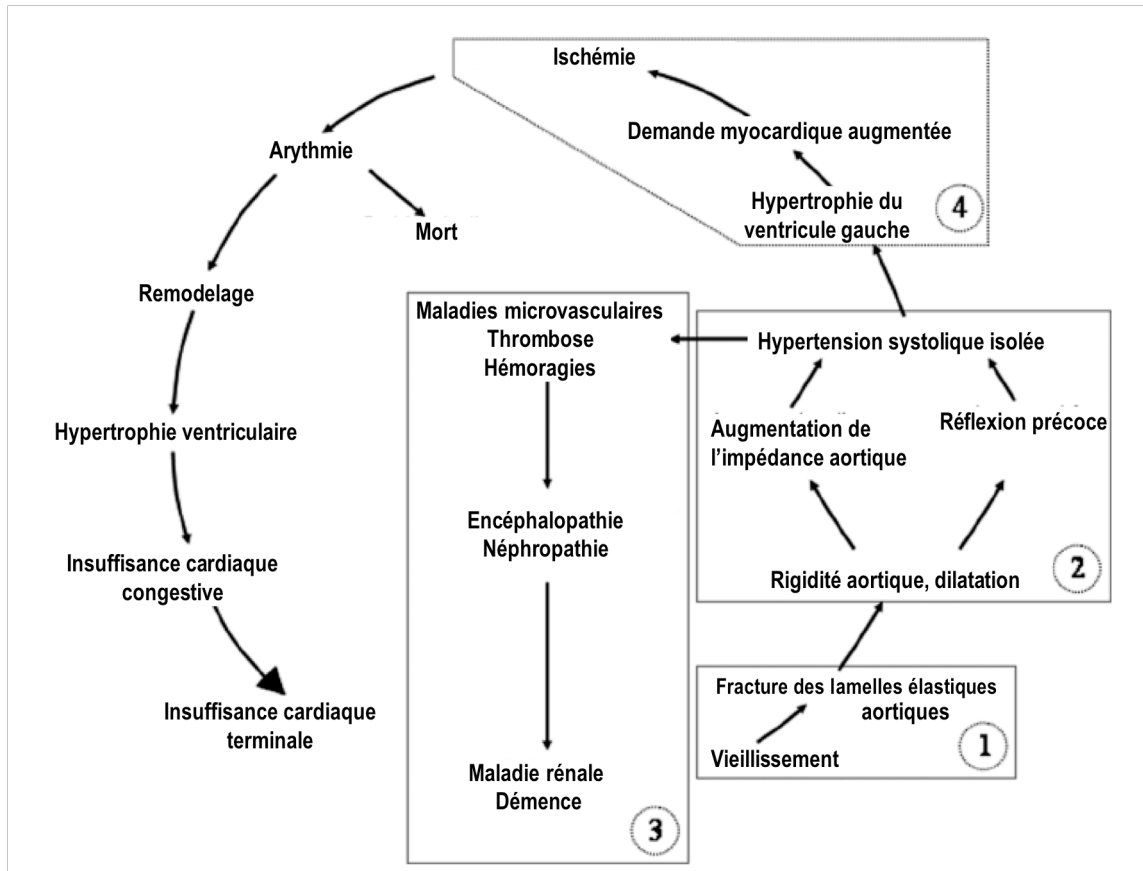


Figure 15: Conséquences pathologiques du vieillissement vasculaire sur le système cardiovasculaire.

Adapté de ^{22,77}.

1.3.2. Modifications des propriétés élastiques des artères de conduction

Le vieillissement vasculaire est un phénomène physiologique normal, qui se développe graduellement avec l'âge, indépendamment de la pression artérielle ou de la présence de maladies vasculaires concomitantes³⁵. Des changements macroscopiques et microscopiques surviennent au niveau de la paroi vasculaire, ce qui a pour conséquence de modifier l'organisation structurale et ainsi, les propriétés mécaniques des gros troncs artériels⁸⁷. Ces changements sont le résultat de l'étirement cyclique subit à chaque battement de cœur, amenant une fatigue du réseau élastique, ce qui explique que l'âge et la fréquence cardiaque

soient deux déterminants majeurs de la fatigue des vaisseaux (Figure 16). En effet, chaque battement de cœur produit un étirement de 10% de l'aorte et des artères élastiques proximales⁸⁸, et cet étirement se produit près de 30 millions de fois par année à un rythme cardiaque de 70 battements par minute⁷⁷.

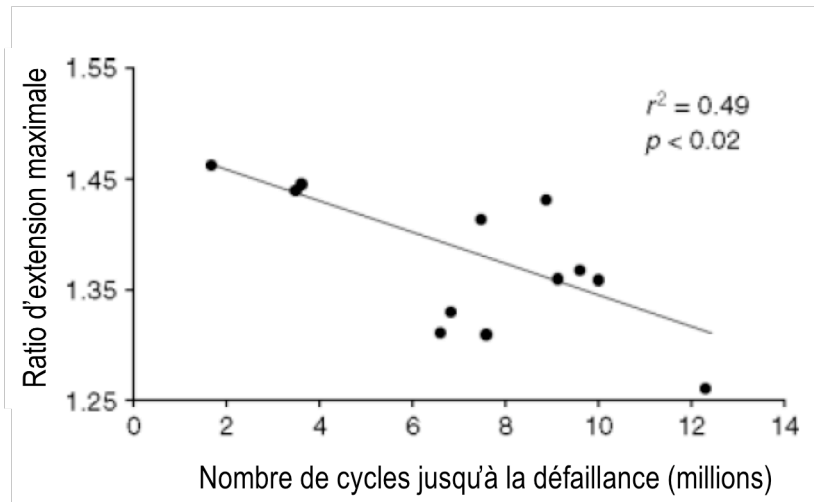


Figure 16: Relation entre l'étirement d'un vaisseau et la fatigue du réseau élastique.

Adapté de ⁵⁴.

Ces changements attribuables au vieillissement sont hétérogènes le long de l'arbre vasculaire. Les vaisseaux élastiques sont davantage affectés par le vieillissement, alors que les artères musculaires ne subissent pas le même genre de fatigue, subissant un étirement d'environ 3% seulement⁸⁹. Un remodelage eutrophique interne est tout même observé dans les artères musculaires. Les changements macroscopiques consistent en une augmentation du rayon de la lumière du vaisseau, ainsi qu'en un épaissement de la média. En effet, le diamètre de l'aorte humaine est augmenté de près de 20% chez les sujets âgés de plus de 65 ans comparativement à des sujets plus jeunes⁹⁰. L'augmentation du diamètre des vaisseaux et l'épaississement de la média seraient des phénomènes adaptatifs mis en place pour compenser l'augmentation la dilation radiale⁸⁷ et l'augmentation de contrainte pariétale due à la rigidité vasculaire et limiter son impact néfaste sur la circulation artérielle⁹¹. L'intima s'épaissit

également, et cette épaisseur peut même tripler au niveau de la l'artère carotidienne entre 20 et 90 ans⁹² suite à l'augmentation de la perméabilité de la membrane basale favorisant la migration des CMLV de la média vers l'intima⁹³. Au niveau microscopique, le réseau tridimensionnel de CMLV, de collagène et d'élastine se réorganise en fonction de l'âge du sujet. Les CMLV s'hypertrophient et la MEC est altérée suite à l'augmentation de la synthèse de collagène⁹⁴, à l'augmentation des liens covalents entre les fibres de collagène empêchant ainsi son hydrolyse⁹⁵ et à l'accumulation de fibronectine, tous des facteurs contribuant à l'épaississement de la média et à une fragmentation du réseau élastique⁹⁶. L'altération de la MEC joue un rôle majeur dans les modifications de propriétés des gros vaisseaux, puisque l'augmentation de la synthèse de collagène et la fragmentation de l'élastine diminuent le ratio élastine/collagène, ce qui affecte les propriétés mécaniques des gros vaisseaux, notamment en augmentant leur rigidité (Figure 17).

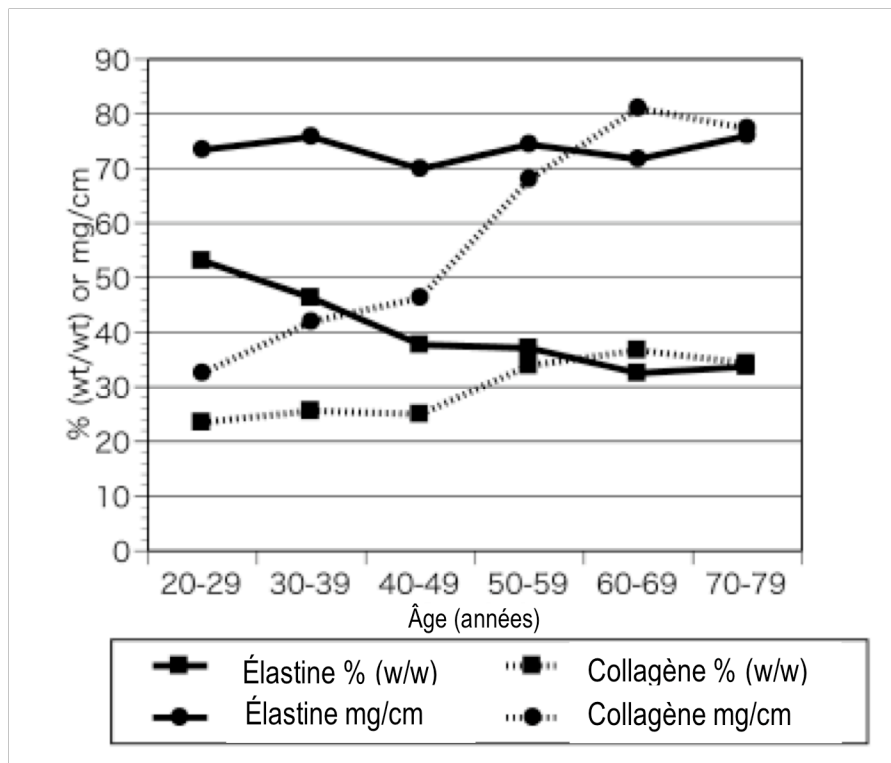


Figure 17: Évolution de la composition relative et absolue en élastine et en collagène d'un vaisseau selon l'âge.

Adapté de ⁹⁷.

1.3.2.1. Fibrose

La stabilité du collagène est remarquablement élevée. Par exemple, les demi-vies des collagènes de type I et II au niveau des disques intervertébraux peuvent s'élever jusqu'à 115 ans⁹⁸. Dans la paroi vasculaire, c'est principalement le collagène de type I qui confère au vaisseau sa rigidité⁹⁹. Chez des rats WAG/Rij, pour lesquels la pression systolique ne varie pas avec l'âge dans une fenêtre de 6 à 30 mois, le contenu aortique en collagène double durant cette période, alors que le contenu en élastine ne change pas, résultant en une proportion relative d'élastine diminuée¹⁰⁰. La majorité des études démontrent que le contenu en collagène des parois vasculaires, en valeur absolue, augmenterait avec l'âge chez l'humain^{54,87}. Par contre, une autre étude a démontré l'opposé, à savoir que ce contenu diminuait¹⁰¹. Des résultats divergeants ont aussi été obtenus lorsque la quantité de collagène était exprimée en termes de concentrations dans le tissu, et il en est de même pour l'élastine¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Ainsi, il a été suggéré que l'organisation supramoléculaire des composantes de la MEC et non pas sa composition comme telle procurait un meilleur aperçu des propriétés mécaniques d'un vaisseau^{87,105}.

1.3.2.2. Dégradation de l'élastine

La déposition d'élastine débute *in utero* et atteint son apogée lors de la période *post-natale* en réponse aux changements hémodynamiques. Dans les tissus matures, la synthèse d'élastine est négligeable, suite à l'activation de mécanismes *post-transcriptionnels*¹⁰⁶. Chez la souris, la synthèse d'élastine n'est plus détectable après l'âge de 3 semaines¹⁰⁷. Le renouvellement de l'élastine dans la MEC est extrêmement lent: la demi-vie de l'élastine dans l'aorte humaine est estimée à près de 70 ans¹⁰⁸ et il a d'ailleurs été suggéré que l'élastine ne serait à peu près pas remplacée tout au long de la vie d'un individu, ce qui la rend particulièrement vulnérable à l'accumulation de dommages et à la dégradation, par l'intermédiaire de mécanismes enzymatiques, chimiques et biophysiques³⁵. Il n'est alors pas surprenant de constater que chez l'humain, le module de Young est augmenté de 1000% durant la période allant de 20 à 80 ans⁷⁷. Les propriétés de l'élastine sont modifiées avec l'âge principalement en raison de l'augmentation de l'activité protéolytique de l'élastase et des MMP, à la désorganisation progressive et à l'amincissement des fibres élastiques, au stress

oxydant, à la glycation non-enzymatique et la formation des *advanced-glycosylation end-products* (AGE) ainsi qu'à la calcification des lamelles élastiques¹⁰⁹. Par exemple, l'expression aortique de MMP-2 est triplée chez les rats âgés de 30 mois comparativement à ceux âgés de 6 mois¹¹⁰. Malgré le fait que cette augmentation est observée au niveau de l'intima, elle démontre tout de même le déséquilibre local entre MMP-2 et ses inhibiteurs. La calcification dont il est question est distincte de la calcification intimale, et les termes élastocalcinose ou calcification médiale sont utilisés pour la distinguer des autres types de calcification vasculaire. Dans ce cas-ci, le calcium s'accumule au sein de la media et se fixe aux microfibrilles des fibres élastiques¹¹¹. Il a été démontré que le contenu calcique était augmenté de 30 à 40 fois au cours du vieillissement, pour un éventail de sujets âgés de 20 à 90 ans¹⁰⁹.

1.3.2.3. Calcification vasculaire

La calcification vasculaire est un processus pathologique survenant en présence de stimuli particuliers qui provoquent un déséquilibre dans l'environnement vasculaire. Ces stimuli peuvent être par exemple l'âge, l'hypercholestérolémie, le diabète, une néphropathie, une dysfonction endothéliale, un désordre métabolique, l'hyperparathyroïdie ou encore ces stimulus peuvent être dus à des maladies génétiques comme le syndrome de Keutel ou le syndrome de Marfan. Le déséquilibre se répercute au niveau cellulaire, où le contenu relatif des facteurs promouvant la calcification et ceux l'inhibant est modifié^{112,113}. Il existe quatre types de calcification vasculaire, soit la calcification médiale, la calcification intimale des plaques athérosclérotiques, la calcification des valves cardiaques et l'artériolopathie urémique calcifiante^{114,115}. Les mécanismes pathophysiologiques et les conséquences cliniques des différents types de calcification sont distincts^{116,117}, quoique qu'ils soient considérés comme non-mutuellement exclusifs¹¹⁸ et contribuant de façon synergique l'un à l'autre¹¹⁹. La calcification intimale peut être présente indépendamment de la présence la calcification médiale et *vice versa*¹¹³. La calcification médiale décrite en 1903 par Mönckeberg se définissait comme survenant en l'absence de plaque athéromateuse¹²⁰. Or, grâce à de nouvelles techniques d'analyse, il a été démontré que ces deux types de calcification pouvaient survenir de façon concomitante¹²¹ et qu'ils partagent même plusieurs similarités^{114,122}. Les prochains

paragaphes vont, en premier lieu, aborder brièvement le sujet de la calcification intimale, pour ensuite s'attarder plus en détails sur la calcification vasculaire médiale.

1.3.2.3.1. Calcification intimale

La calcification intimale est associée aux plaques athéromateuses, et implique l'infiltration de lipides, de macrophages, de cellules T et de mastocytes¹²³. Ce type de calcification comporterait des similitudes avec la calcification endochondrale^{115,119,124}, caractérisée par la formation d'un intermédiaire cartilagineux possédant une certaine architecture, ce qui est en contraste avec la calcification dite amorphe qui n'en possède pas. Une calcification amorphe peut aussi être observée, surtout dans les premiers stades^{123,125}. Il se produit une calcification du noyau lipidique de la plaque¹²⁶, ainsi qu'une calcification de la chape fibreuse¹²⁷. Des cristaux d'hydroxyapatite peuvent être détectés même dans des lésions athéromateuses précoces¹²⁸.

Le noyau lipidique de la plaque athéromateuse est composé de lipides, de cellules inflammatoires et de débris cellulaires provenant de cellules nécrosées¹¹⁵. La présence de lipides oxydés et de cellules inflammatoires promeut un signal ostéogénique provoquant une dédifférenciation ostéoblastique/*chondrocyte-like* d'une sous-population de cellules vasculaires^{112,126,129}. Ce même signal induit la différenciation des myofibroblastes en ostéoblastes et en chondrocytes¹¹⁵. Ce signal favorise également l'expression de protéines reliées au métabolisme osseux comme l'ostéocalcine (OC), l'ostéopontine (OPN) et l'alkaline phosphatase (ALP)¹³⁰, en plus de facteurs de transcription tels que la *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2), la *Msh homebox 2* (Msx2), la *Runt-related transcription factor 2* (Runx2) et la Sox9¹²⁶.

1.3.2.3.2. Calcification médiale

La calcification médiale des gros troncs artériels, aussi appelée élastocalcinose ou artériosclérose de Mönckeberg, augmente de façon constante avec l'âge. Ainsi, alors que seulement 4% des personnes de moins de 30 ans seraient affectées, elle est présente chez près de la totalité des personnes âgées de 50 ans et plus¹³¹. En plus d'être associée à l'âge, la calcification médiale est fréquemment observée chez les patients souffrant de diabète ou de maladies rénales. La calcification artérielle médiale corrèle avec la présence de maladies coronariennes et le risque d'événements cardiovasculaires chez les diabétiques de type 1¹¹³.

Morphologiquement, la calcification artérielle médiale se présente initialement par des dépôts d'hydroxyapatite le long des lamelles élastiques. Éventuellement, ces cristaux d'hydroxyapatite iront jusqu'à former des cercles concentriques tout le long de la média¹³². Les caractéristiques morphologiques de la calcification vasculaire partagent également celles des os, à savoir la présence de vésicules matricielles et la présence de sous-populations de cellules dont le phénotype est propice au développement d'une matrice calcifiée. Ce type de calcification peut s'apparenter à une ossification intramembranaire, c'est-à-dire qui ne nécessite pas la formation d'un intermédiaire de cartilage^{112,115,119,132,133}.

1.3.3. Mécanismes impliqués dans le développement de la calcification vasculaire

Il est suggéré que selon le contexte pathophysiologique, différents mécanismes puissent être à l'origine de la calcification artérielle médiale. Les principaux sont décrits ci-bas.

1.3.3.1. Apoptose des cellules de muscle lisse vasculaire

L'apoptose des CMLV entraîne la formation de débris cellulaires et de corps apoptotiques qui servent de sites de nucléation pour la déposition de calcium et de phosphate¹³⁴. Les cellules apoptotiques sont en effet particulièrement perméables au calcium et au phosphate, et elles emmagasinaient ces ions à des concentrations supérieures à leur

produit de solubilité. Il est aussi suggéré que les vésicules matricielles pourraient être issues des cellules apoptotiques¹³⁵. Un modèle de calcification *in vitro* dans lequel les CMLV calcifient spontanément après ~28 jours de culture a par ailleurs permis de démontrer que l'apoptose des CMLV survenait avant l'apparition de la calcification et que la modulation de l'apoptose avait un effet direct sur la calcification¹³⁴.

1.3.3.2. Désordres du métabolisme osseux

Il existerait un lien entre la résorption osseuse amenée par l'augmentation de l'activité ostéoclastique et la calcification vasculaire¹³⁶. En effet, la présence d'ostéoporose est associée à la calcification vasculaire chez les femmes ménopausées. Il est proposé que l'activité ostéoclastique générerait des complexes de nucléation qui s'introduiraient dans la circulation sanguine pour ensuite promouvoir la calcification des tissus mous¹³⁷. L'administration de biphosphonates, des analogues de structure du pyrophosphate inorganique, inhibe le développement de la calcification vasculaire chez le rat dans deux modèles différents de calcification vasculaire et ce, à des doses similaires à celles administrées pour inhiber la résorption osseuse dans ce même modèle^{136,138}. Deux mécanismes sont proposés pour expliquer cet impact des biphosphonates au niveau vasculaire: soit l'inhibition de la résorption osseuse diminue les concentrations circulantes de calcium et de phosphate et par conséquent diminue la probabilité de formation de complexes de minéralisation, soit les biphosphonates agissent directement au niveau cellulaire, puisque les CMLV adoptent des caractéristiques ostéoblastique et ostéoclastique aux sites de calcification¹³². D'autre part, le lien entre l'ostéoporose et la calcification vasculaire est aussi mis en évidence dans le modèle de souris déficientes en ostéoprotégérine (OPG). L'OPG est une glycoprotéine de la superfamille des récepteurs au *Tumor Necrosis Factors* (TNF), initialement identifiée comme étant un régulateur clé de la résorption osseuse en inhibant le développement des ostéoclastes *in vitro* et *in vivo*¹³⁹ et donc en agissant comme protecteur osseux. Elle est sécrétée au niveau des os par les ostéoblastes, mais aussi par des composantes du système cardiovasculaire incluant les cardiomyocytes¹⁴⁰, les cellules endothéliales et les CMLV^{141,142}. Le mécanisme d'action de l'OPG repose sur sa capacité à agir comme récepteur-piège pour le *receptor activator of*

nuclear factor κ B ligand (RANKL). RANKL est sécrété principalement par les cellules T et les cellules endothéliales activées tandis que RANK (*receptor activator of nuclear factor κ B*) est exprimé à la surface des ostéoclastes et des précurseurs ostéoclastiques¹⁴³. La liaison de RANKL à son récepteur, RANK, induit le signal pour la différenciation des ostéoclastes et pour l'activation des ostéoclastes matures¹⁴⁴. Ainsi, en liant RANKL, l'OPG empêche la signalisation ostéoclastique et contribue à la résorption osseuse¹⁴³. Les souris OPG -/- souffrent d'ostéoporose sévère, alors que les artères rénales et l'aorte de ces animaux présentent une calcification médiale¹⁴⁵. Étant donné que le phénotype ostéoporose/calcification vasculaire est retrouvé fréquemment chez les patients humains également, il a été suggéré que l'OPG pourrait jouer un rôle central unissant les désordres du métabolisme osseux au niveau des os mais aussi de la vasculature^{141,146}.

1.3.3.3. Facteurs pro-calcifiants

Un autre mécanisme avancé pour expliquer le développement de la calcification vasculaire est la différenciation d'une sous-population de CMLV vers un phénotype ostéogénique¹⁴⁷. En effet, les CMLV ont originalement un phénotype contractile et par conséquent présentent une expression élevée de gènes codant pour des protéines impliquées dans la structure et la fonction des myofilaments. Toutefois, les CMLV conservent une plasticité qui leur permet de s'adapter à certains changements dans leur environnement local¹⁴⁸, ce qui peut entraîner un changement vers un phénotype synthétique et prolifératif menant à la production de MEC et à la minéralisation de cette matrice¹¹⁴. Il est possible d'observer ce changement phénotypique lorsque des CMLV sont isolées de la média et mises en culture en présence de différents éléments comme par exemple des concentrations élevées de phosphate¹⁴⁹ ou de calcium¹⁵⁰. L'origine de ces cellules ostéoblastes-*like* dans la paroi vasculaire est toutefois controversée et continue à être un sujet de recherche très étudié. Parmi les possibilités suggérées jusqu'à maintenant, notons les cellules vasculaires calcifiantes (CVC), un groupe de cellules identifiées par le groupe de Demer *et al.* et qui représente une sous-population de CMLV calcifiant spontanément lorsque maintenues en culture pour de longues périodes¹⁴⁷, les péricytes résidant dans la paroi vasculaire¹⁵¹, les cellules souches

circulantes¹¹⁹ ou encore les myofibroblastes adventitiels¹¹⁵. La particularité de ces cellules ostéoblaste-*like* est qu'elles expriment des facteurs de transcription impliqués dans l'ostéogenèse, notamment Runx2, Msx-2, osterix et BMP-2. Il est proposé que ce changement phénotypique serait induit par une altération dans les voies de signalisation associées à la superfamille de TGF- β ¹⁵², et que le signal serait initié au niveau du *vasa vasorum* pour se propager ensuite vers la média¹⁵³. Par exemple, plusieurs études identifient BMP-2, un puissant morphogène osseux, comme étant un médiateur crucial de la calcification vasculaire, de par son action sur son récepteur et la phosphorylation et l'activation subséquente de la voie des Smads (Figure 18) ou même de par des actions non-dépendantes du récepteur¹¹⁹. Le stress oxydant, l'inflammation ou l'hyperglycémie sont des facteurs qui pourraient contribuer à l'induction de la voie BMP-2. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine serait aussi déterminante dans l'initiation du signal ostéogénique et par conséquent dans le développement de la calcification vasculaire. En effet, il est suggéré que cette voie serait, d'une part, impliquée dans une boucle de signalisation autocrine initiée par la liaison de BMP-2 à son récepteur pour ensuite activer l'ALP par l'intermédiaire de Wnt^{126,154-156} (Figure 18), et d'autre part, impliquée de façon paracrine par l'intermédiaire des cellules de l'adventice exprimant Msx-2 qui propagent leur signal vers la média¹⁵⁷ (Figure 19). D'ailleurs, la calcification médiale est réduite significativement suite au retrait de l'adventice chez les rats nourris avec une diète riche en lipides¹⁵⁸.

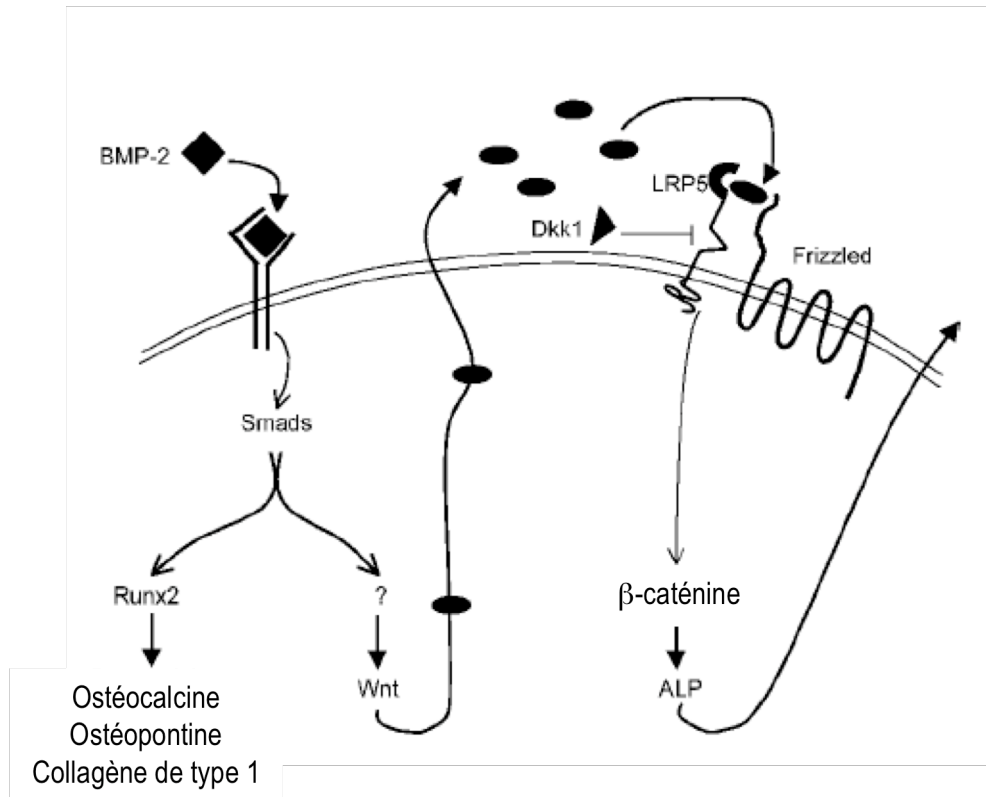


Figure 18: Boucle autocrine impliquant BMP-2, Wnt, ALP.

Adapté de ¹⁵⁶.

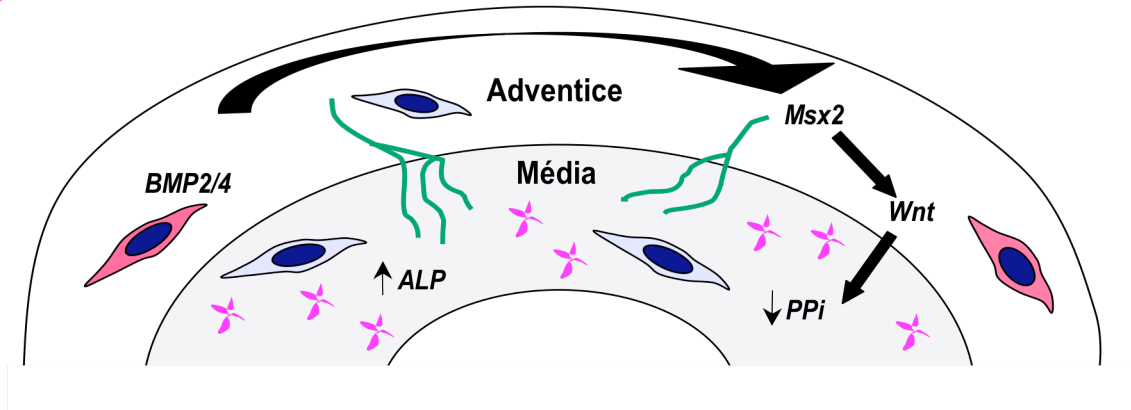
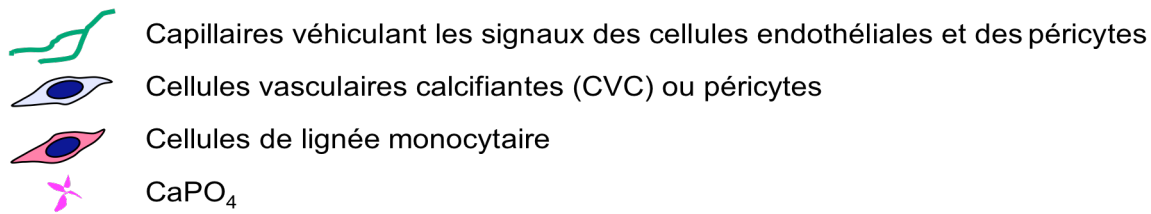


Figure 19: Signalisation paracrine impliquant Msx-2.

Adapté de ¹⁵³.

Finalement, des protéines habituellement associées à la formation osseuse comme l'OC¹⁵⁹, l'OPN¹⁶⁰ et l'ALP sont exprimées par les CMLV au niveau de lésions calcifiées¹³². Selon l'état pathologique associé, comme la présence de diabète par exemple, les voies de signalisation et les facteurs de transcription impliqués peuvent varier¹¹².

L'hyperphosphatémie peut aussi contribuer au développement de la calcification vasculaire médiale. Chez les patients souffrant d'insuffisance rénale, l'équilibre calcium/phosphate est modifié, les concentrations plasmatiques de phosphate étant élevées suite à la diminution de la filtration rénale et à l'hyperparathyroïdie secondaire. Ce déséquilibre serait suffisant pour induire la nucléation de l'apatite, notamment parce que l'hyperphosphatémie favorise la production de corps apoptotiques et de vésicules

matricielles¹⁶¹. Le phosphate a aussi la capacité d'agir en tant que molécule signalétique et de pousser les CMLV vers un changement phénotypique ostéoblastique¹⁶² caractérisé par la surexpression de Runx2^{149,163}. Ce changement phénotypique serait dépendant du co-transporteur de phosphate dépendant du sodium, Pit-1¹⁶³ (Figure 20).

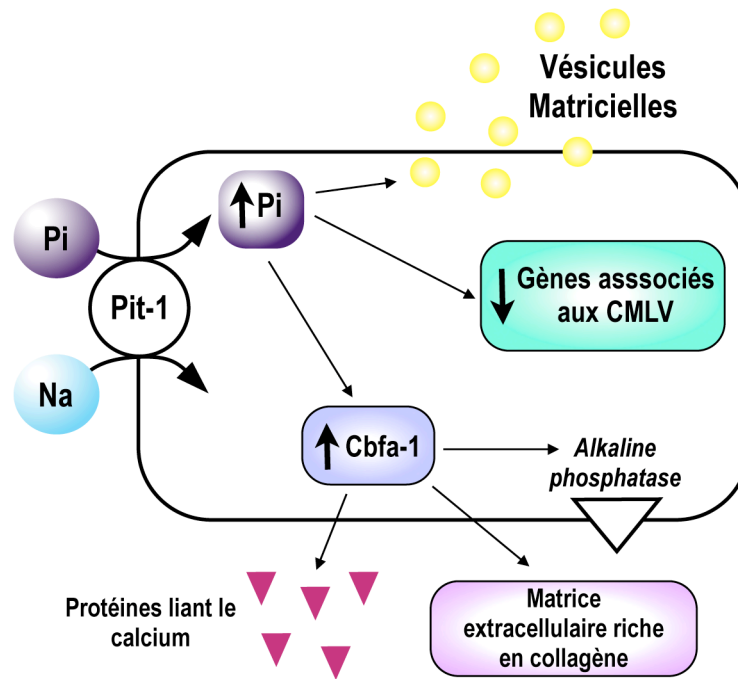


Figure 20: Implication du co-transporteur Pit-1 dans le développement de la calcification vasculaire.

Adapté de ¹⁶⁴.

Finalement, d'autres facteurs comme la vitamine D, la warfarine, les glucocorticoïdes et la leptine peuvent aussi contribuer au développement de la calcification artérielle médiale.

En général, la vitamine D utilisée en traitement contre l'hyperparathyroïdie, augmente les concentrations de calcium et de phosphate circulantes et augmente le risque de calcification. La liaison de la vitamine D à son récepteur induit aussi la transcription de plusieurs gènes codant pour des protéines comme MMP-9, VEGF et le collagène de type 1. *In*

in vitro, le calcitriol augmente l'activité de l'ALP et induit la calcification des CMLV¹⁶⁵. L'effet de la vitamine D est considéré comme étant biphasique, c'est-à-dire que ses effets délétères sur la calcification artérielle se manifesteraient lors d'un excès de vitamine D, mais aussi lors d'une déficience en vitamine D^{166,167}.

La warfarine est un antagoniste de la vitamine K utilisé comme anticoagulant. Les patients traités avec la warfarine ont des scores de calcification coronarienne et valvulaire supérieurs aux sujets contrôles^{168,169}. L'utilisation de glucocorticoïdes est associée à une augmentation de la calcification vasculaire¹⁷⁰. La leptine pourrait jouer un rôle dans la calcification également, puisqu'il a été démontré qu'elle induit la différenciation ostéoblastique et la calcification des CVC *in vitro*¹⁷¹. Les cas de la vitamine D et de la warfarine seront abordés plus en détails lorsque les modèles animaux de calcification vasculaire seront décrits.

1.3.3.4. Facteurs anti-calcifiants

Le milieu extracellulaire des vertébrés contient des concentrations de calcium proches du produit de solubilité de plusieurs sels¹¹². Des mécanismes cellulaires doivent alors être mis en branle pour limiter la calcification des tissus mous. Ainsi, il existe des inhibiteurs de calcification endogènes qui empêchent cette minéralisation spontanée des tissus mous. Ces inhibiteurs ont été identifiés principalement à l'aide de modèles *knockout* chez la souris, ces souris développant un phénotype de calcification vasculaire. Quelques exemples de ces modèles sont donnés dans le Tableau III. Les principales protéines reconnues comme ayant un rôle anti-calcifiant sont les suivantes¹⁷²:

- Fétuine;
- Fibriline;
- Klotho;
- Protéine Gla de la matrice;
- Ostéopontine;
- Ostéoprotégérine.

À cette liste s'ajoute le pyrophosphate, aussi considéré comme ayant un rôle anti-calcifiant.

La majorité de ces éléments sont abordées plus en détails à un endroit ou à un autre dans cette thèse. La protéine Gla de la matrice (MGP) est la protéine qui retiendra notre attention dans le cadre de cette thèse, et ce sujet sera exploré en détails à la section suivante ainsi qu'au Chapitre 4.

1.3.4. La protéine Gla de la matrice

La MGP est au cœur de ce projet de recherche. C'est une protéine qui a beaucoup retenu l'attention au cours des dernières années, suite aux études de fonctionnalité chez la souris qui ont permis de mettre en évidence son rôle physiologique en tant que protéine anti-calcifiante. Nous aborderons en détails notamment les mécanismes par lesquels la MGP inhibe la calcification, les modifications *post*-translationnelles essentielles à son activation, ainsi que les enzymes nécessaires à ces modifications *post*-translationnelles.

1.3.4.1. Présentation et rôles

La MGP est une petite protéine composée de 84 acides aminés lui conférant une masse atomique approximative de 12 à 14 kDa (Figure 21). Elle a initialement été isolée dans le tissu osseux et caractérisée par le groupe de Price *et al.*^{173,174}.

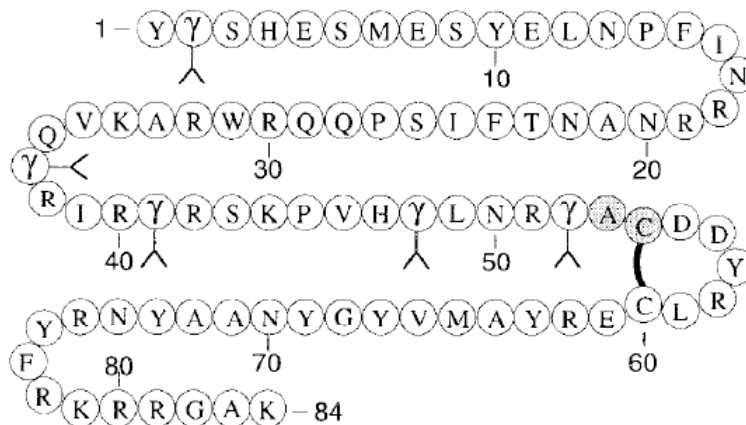


Figure 21: Séquence d'acides aminés de la MGP.

Adapté de ¹⁷⁵.

Il est maintenant reconnu qu'elle est synthétisée par une variété de tissus comme par exemple les reins, les poumons, le cartilage¹⁷⁶ et les CMLV¹⁷⁷. L'expression génique hautement régulée de la MGP dans les tissus embryogéniques suggère qu'elle aurait un rôle à jouer dans le développement¹⁷⁸. La MGP fait partie de la famille des protéines dépendantes de la vitamine K (VKD), c'est-à-dire qu'elle doit subir une modification *post*-translationnelle impliquant la vitamine K comme co-facteur pour être active.

1.3.4.2. Modifications *post*-translationnelles

1.3.4.2.1. γ -Carboxylation

Une des particularités de la MGP est qu'elle fait partie de la famille des protéines VKD. La MGP contient en effet neuf résidus glutamate, dont cinq peuvent être modifiés *post*-translationnellement en résidus γ -carboxyglutamate (Gla) par l'enzyme γ -carboxylase. Cette réaction a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE). La fonction des résidus Gla est de lier le calcium¹⁷⁵. Cette modification *post*-translationnelle serait indispensable à l'activité de la MGP.

Jusqu'à maintenant, quatorze protéines VKD ont été identifiées chez l'humain, dont sept étant les protéines impliquées dans la cascade de coagulation¹⁷⁹. Les souris GGCX -/- ne se rendent pas à terme ou meurent à la naissance d'hémorragies intra-abdominales¹⁸⁰. La réaction de γ -carboxylation nécessite du CO₂, du O₂ et de la vitamine K sous sa forme réduite, l'hydroquinone (KH₂) (Figure 22). La vitamine KH₂ agit comme co-facteur de la réaction, puisque c'est l'énergie de l'oxydation de la vitamine K réduite en un produit de vitamine K oxydée qui permet la modification des résidus Glu en résidus Gla¹⁸¹. Par la suite, la vitamine K époxyde réductase (VKOR) réduit le produit époxyde pour former la vitamine KH₂ à nouveau. La VKOR est donc l'enzyme responsable du recyclage de la vitamine K. La DT-diaphorase est une voie alternative pour assurer le recyclage de la vitamine K, active principalement au niveau du foie, notamment pour carboxyler les facteurs de coagulation synthétisés dans le foie. L'appellation "vitamine K" provient d'ailleurs de l'abréviation de *koagulations vitamin*, le facteur antihémorragique identifié en 1935 par Henrik Dam, découverte qui lui a valu le prix Nobel¹⁸². Dans le cas des protéines VKD impliquées dans la coagulation, la γ -carboxylation des résidus Glu de ces protéines induit un changement de conformation calcium-dépendant qui leur permet d'interagir avec les membranes phospholipidiques¹⁸³. La DT-diaphorase est par contre environ 100 fois plus active dans le foie qu'elle ne l'est dans les CMLV¹⁷⁷, et elle n'est pas affectée par l'administration de la warfarine¹⁸⁴. C'est cette enzyme qui fait en sorte que l'administration de la vitamine K aux rats du modèle warfarine/vitamine K (WVK) suffise à éviter les troubles de coagulation induit par la warfarine, tout en obtenant l'effet voulu de la warfarine au niveau vasculaire, c'est-à-dire la calcification artérielle médiale¹⁸⁵.

Dans la réaction de γ -carboxylation, un proton est extrait du carbone γ , et remplacé par un groupement carboxyle¹⁸⁶. Un carbanion est généré lors de l'étape intermédiaire¹⁸⁶.

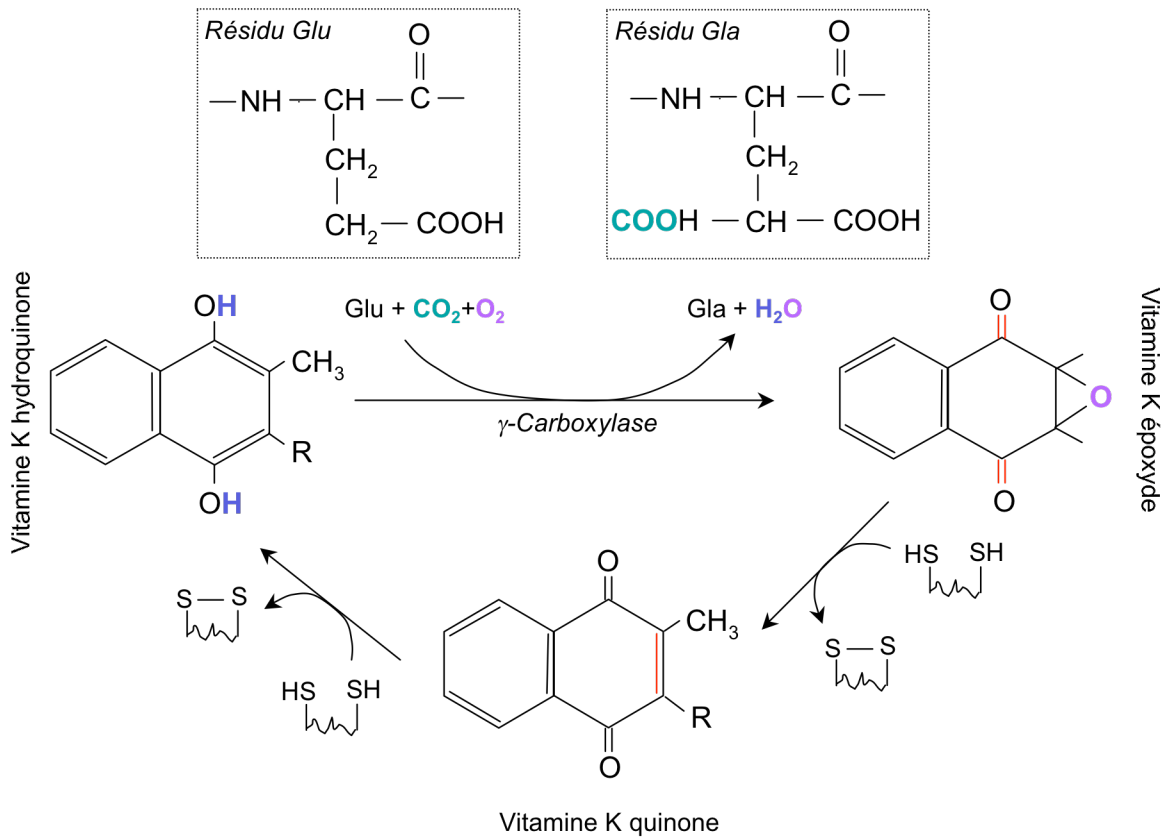


Figure 22: Cycle de la vitamine K et γ -carboxylation des résidus Glu.

L'agent réducteur n'est pas encore identifié. Adapté de ¹⁸⁷.

1.3.4.2.2. Phosphorylation

La MGP contient aussi 5 résidus sérine, dont 3 peuvent être phosphorylés. Par contre, le rôle de la phosphorylation dans l'activité de la MGP n'est pas encore tout à fait clair. Il a tout de même été démontré que la MGP phosphorylée quitterait la cellule *via* la voie sécrétoire, alors que la MGP non-phosphorylée demeurerait au niveau du cytosol¹⁸⁸.

1.3.4.3. Enzymes impliquées dans la γ -carboxylation de la MGP

1.3.4.3.1. γ -Carboxylase

L'activité γ -carboxylase a été démontrée pour la première fois en 1975, au niveau hépatique¹⁸⁹. L'activité au niveau aortique a été démontrée en 1987¹⁹⁰. L'enzyme a par la suite été isolée et purifiée près de 10 ans plus tard¹⁹¹. La γ -glutamyl-carboxylase est une enzyme microsomale de 94 kDa, ancrée dans la membrane du RE rugueux (Figure 23). Son expression est retrouvée dans tous les tissus, à l'exception des tendons et du cerveau¹⁹². Elle est composée de 758 acides aminés et posséderait cinq domaines transmembranaires¹⁹³. Les résidus 345-355 de la γ -carboxylase humaine seraient ceux liant les protéines VKD¹⁸⁷. De plus, les Cys99 et Cys450 seraient essentielles à l'activité de la γ -carboxylase¹⁹⁴. Une seule enzyme γ -carboxylase est responsable pour la γ -carboxylation de toutes les protéines VKD¹⁸⁰.

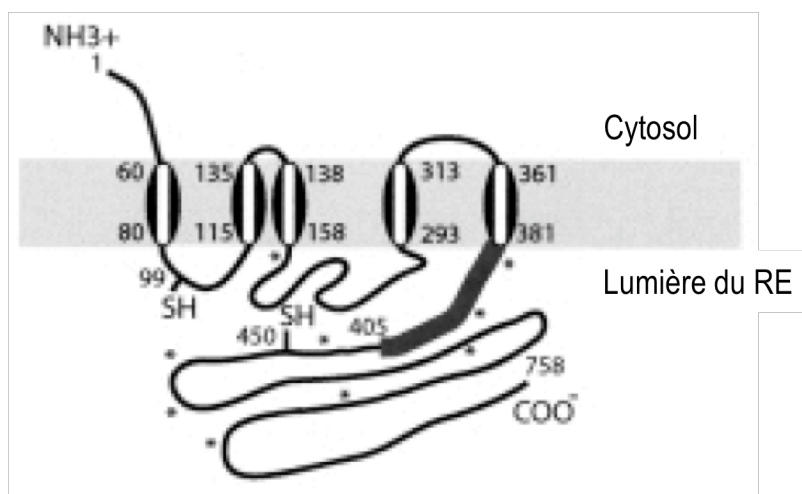


Figure 23: Topologie membranaire de la γ -carboxylase.

Adapté de ^{179,193}.

Le rôle de la γ -carboxylase est de carboxyler les protéines VKD. La classification suivante permet de distinguer les différentes catégories de protéines Gla, selon leur fonction¹⁹⁵:

Fonction	Protéine VKD
Homéostasie (pro-coagulant)	Prothrombine, Facteurs VII, IX et X
Homéostasie (anticoagulant)	Protéines C, S et Z
Inhibition de la calcification artérielle	MGP
Métabolisme osseux	Ostéocalcine

Régulation de la croissance cellulaire	Gas6
Inconnue	Gla-Rich Protein, Periostine, Periostin-like factor, Four transmembrane Gla-proteins

Tableau II: Liste des protéines VKD.

Afin d'incorporer les résidus Gla, la γ -carboxylase procède à deux réactions: la conversion des résidus Glu en résidu Gla, et l'époxydation de la vitamine KH_2 en vitamine K époxyde (KO). Toutefois, la γ -carboxylase est régulée de telle sorte que l'époxydation n'a lieu que si une protéine VKD y est liée¹⁹⁶. Il est suggéré que la γ -carboxylase posséderait plusieurs sites essentiels à son activité¹⁹⁷ (Figure 24):

- Site de l'activité γ -carboxylase;
- Site de l'activité époxydase;
- Site de liaison du propeptide du substrat;
- Site de liaison de la vitamine K.

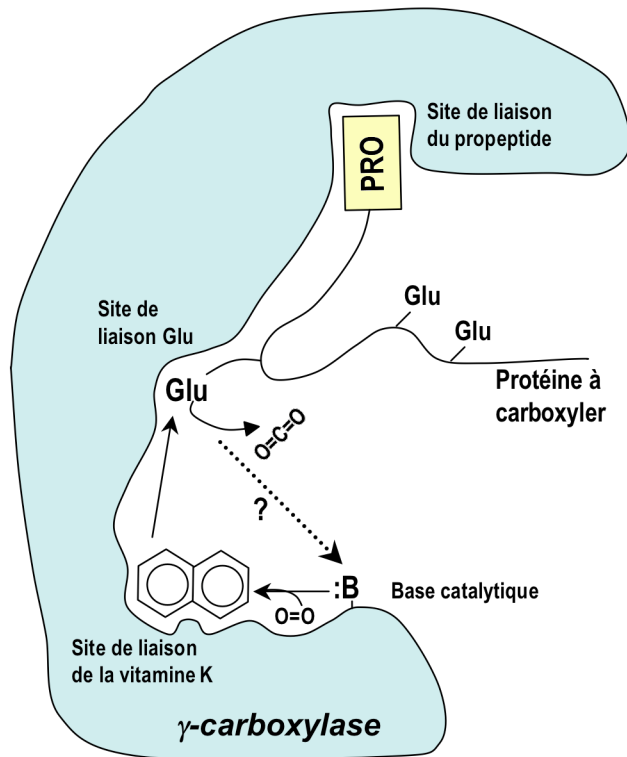


Figure 24: Les sites de liaison de la γ -carboxylase.

Adapté de ¹⁹⁸.

Par contre, l'identification des séquences d'acides aminés spécifiques à ces sites n'est pas confirmée¹⁷⁹. Il est proposé que le résidu Lys218 serait essentiel à l'activité γ -carboxylase¹⁹⁹. D'autre part, la région 393-404 lui permettrait de lier les résidus Glu²⁰⁰. Ces sites de liaison font face à la lumière du RE, et c'est d'ailleurs dans la lumière du RE que la réaction de γ -carboxylation se produit^{193,201,202}. Les protéines VKD impliquées dans la coagulation sont synthétisées dans le foie sous forme de pré-proprotéine, et elles possèdent un domaine propeptide composé de 18 acides aminés (résidus 495-513) situé en amont du domaine Gla, permettant la liaison au site de liaison propeptide de la γ -carboxylase²⁰³. La MGP est également synthétisée sous forme de pré-proprotéine mais toutefois, elle ne possède pas de séquence propeptide²⁰⁴. En effet, la MGP possède une séquence homologue à la séquence des autres protéines VKD mais cette séquence se retrouve au niveau des résidus 15-30, encadrée de part et d'autre du domaine Gla²⁰⁴ (Figure 25).

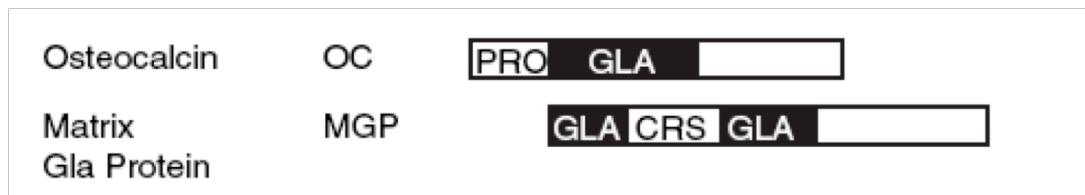


Figure 25: Organisation des différents domaines de protéines VKD comme l'ostéocalcine et la MGP.

PRO: propeptide, GLA: domaine Gla, CRS: *carboxylase recognition sequence*. La différence importante à noter est qu'en comparaison avec toutes les autres protéines VKD, la MGP possède son site de reconnaissance de la γ -carboxylase en milieu de séquence, ainsi que son domaine Gla de part et d'autre de cette CRS. Adapté de ²⁰⁵.

Suite à la γ -carboxylation, la protéine γ -carboxylée est transportée vers l'appareil de Golgi pour subir d'autres modifications telle que la glycosylation, puis la séquence propeptide est éliminée par protéolyse²⁰², et finalement la protéine γ -carboxylée est sécrétée à l'extérieur de la cellule¹⁹⁸ (Figure 26). Les mécanismes par lesquels les protéines VKD quittent le RE ne sont pas connus, mais il est proposé que des protéines cargo seraient impliquées dans le processus, quoiqu'elles n'aient pas encore été identifiées¹⁹⁸. L'affinité de la γ -carboxylase pour le domaine propeptide modulerait l'activité de cette dernière¹⁹⁸. Une fois la séquence propeptide liée à la γ -carboxylase, l'affinité de la γ -carboxylase pour les résidus Glu augmente²⁰⁶. La γ -carboxylase serait en mesure d'accomplir la γ -carboxylation de plusieurs résidus Glu lors d'un seul événement de liaison, avant de relâcher la protéine, en supposant que le taux de dissociation de la séquence propeptide est plus lent que le taux de γ -carboxylation lui-même. C'est la raison pour laquelle la γ -carboxylase est qualifiée d'enzyme "processive"²⁰⁷. Il est estimé que la vitesse de γ -carboxylation dépendrait du taux d'occupation des sites de liaison de la γ -carboxylase par les résidus Glu et les co-facteurs, soit la vitamine KH_2 , le CO_2 et le O_2 , lui-même déterminé par la concentration et l'affinité de ces derniers¹⁷⁹. Ainsi, il est suggéré que la présence de protéines partiellement γ -carboxylées serait la conséquence d'une relâche trop rapide par rapport à la vitesse de γ -carboxylation.

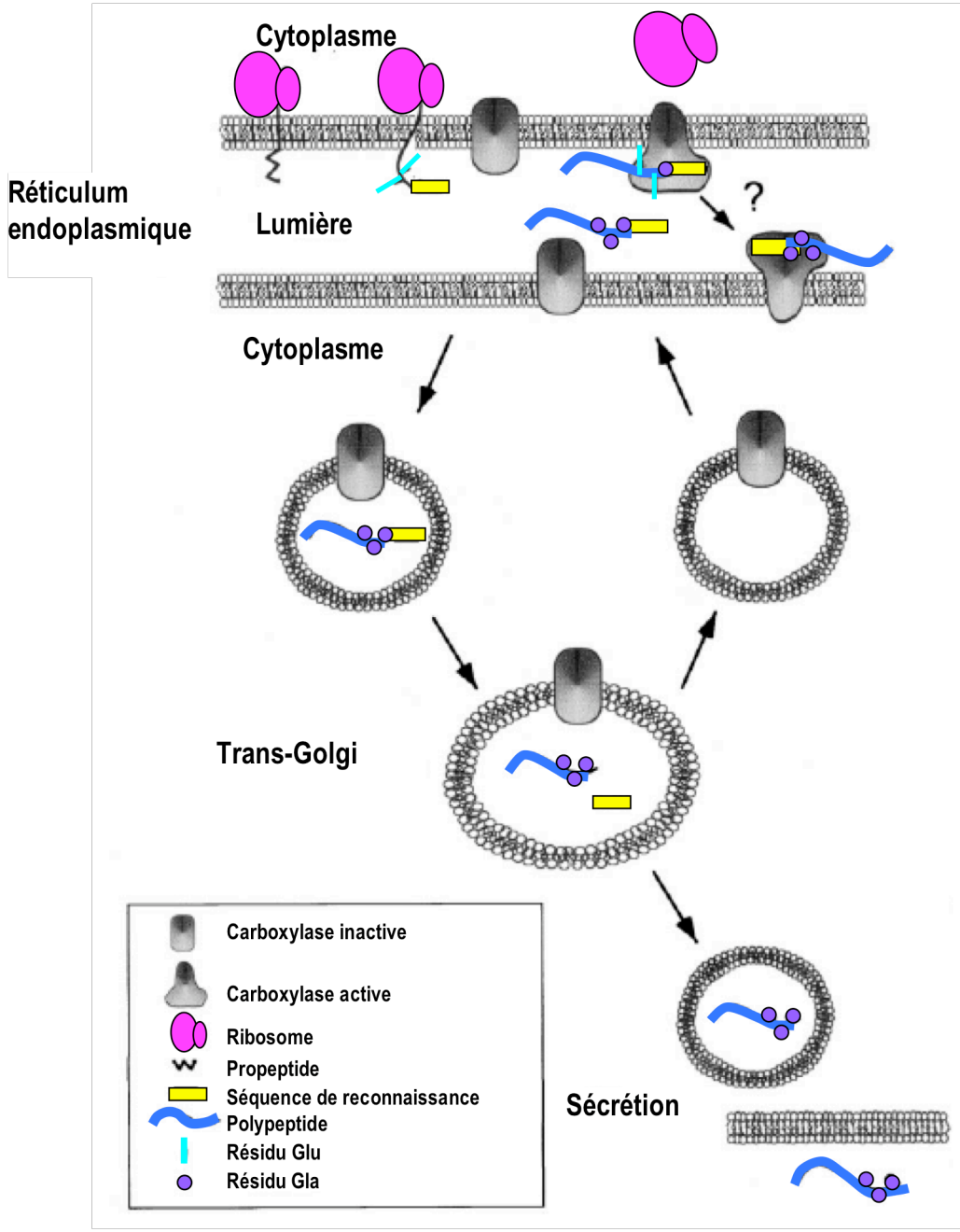


Figure 26: Processus de γ -carboxylation.

La protéine VKD se lie à la γ -carboxylase grâce à la séquence de reconnaissance. Cette liaison activerait la γ -carboxylase. La protéine γ -carboxylée est amenée jusqu'à l'appareil de Golgi où la séquence propeptide est clivée, puis la forme mature de la protéine est sécrétée. Adapté de 197

Les mutations génétiques affectant la γ -carboxylase résultent principalement en des troubles de la coagulation. Des mutations faux sens de la γ -carboxylase ont aussi été identifiées chez les patients souffrant du syndrome nommé pseudoxantheme élastique-*like*, un désordre causant la minéralisation et la fragmentation des fibres élastiques en plus des troubles de coagulation²⁰⁸. D'autre part, il est possible que des modifications dans l'activité de la γ -carboxylase puissent aussi être reliées à des états pathologiques. En effet, il a été démontré que l'activité de la γ -carboxylase était diminuée de 70% dans des artères athérosclérotiques comparativement à des artères normales²⁰⁹. Une altération de l'activité et de l'expression de la γ -carboxylase est aussi retrouvée au niveau du cortex rénal chez des patients atteints de lithiase urinaire^{210,211}. Dans ce cas-ci, la γ -carboxylase est responsable de γ -carboxyler la UPTF1, une protéine VKD qui inhibe la croissance et l'agrégation des calculs d'oxalate de calcium. De plus, il a été démontré que les polymorphismes affectant GGCX, le gène codant pour la γ -carboxylase, étaient associés à des modifications du ratio des concentrations plasmatiques d'OC carboxylée/OC non-carboxylée (*cOC/ucOC*), sans que les concentrations de vitamine K ne soient affectées²¹². Ceci démontre bien l'impact que peut avoir la γ -carboxylase sur la γ -carboxylation de l'OC, indépendamment de la vitamine K.

La γ -carboxylation incomplète des protéines VKD impliquées dans la coagulation est considérée comme une manifestation clinique rare, ce qui semble indiquer que l'apport en vitamine K ainsi que son recyclage soient suffisants pour assurer la γ -carboxylation adéquate de ces protéines. Par contre, ce n'est pas le cas pour l'OC circulante, pour laquelle la forme non-carboxylée est retrouvée fréquemment au niveau plasmatique. Par contre, les conséquences de cette γ -carboxylation incomplète ne sont pas tout à fait élucidées, mais elle suggère tout de même une utilisation de la vitamine K spécifique selon le tissu²¹³. Il est à noter que l'OC posséderait deux sites de liaison pour la γ -carboxylase, un premier site démontrant une faible affinité²¹⁴, et un second site démontrant une haute affinité mais n'ayant pas été identifié à ce jour²¹⁵. Certaines protéines VKD partiellement γ -carboxylées sont dégradées par le protéasome²¹⁶.

1.3.4.3.2. VKOR

La VKOR est une protéine composée de 163 acides aminés, pour un poids moléculaire de 18 kDa. Elle est exprimée de façon ubiquitaire²¹⁷, mais de façon prédominante au niveau du foie, des reins, du cœur et du muscle squelettique²¹⁸. Son activité a été découverte en 1970²¹⁹. Tel que mentionné auparavant, la VKOR est l'enzyme qui réduit la vitamine KO, pour former la vitamine KH₂, dans l'ordre KO → K → KH₂ et ce, à un seul et unique site sur la VKOR²²⁰. La vitamine KH₂ est essentielle à la réaction de γ -carboxylation, puisque la γ -carboxylase utilise l'énergie de l'oxygénation de la vitamine KH₂ pour carboxyler les résidus Glu, dans une réaction 1:1, c'est-à-dire que chacune des molécules de vitamine KH₂ peut servir à la γ -carboxylation d'un résidu Glu. L'identification du gène codant pour la VKOR a été réalisée tout récemment, en 2004²²¹. Sa purification, quant à elle, a été réalisée en 2006²²². Une des difficultés liée à sa purification découle du fait que les détergents utilisés pour solubiliser la membrane du RE dénaturaient l'enzyme et la rendait inactive²²². Cette constatation a par la suite mené à l'hypothèse que le site actif de la VKOR serait ancré dans la membrane du RE, à l'instar de la γ -carboxylase, indiquant que l'environnement lipidique est essentiel à son activité²²³.

La VKOR serait l'étape limitante du système de γ -carboxylation²²⁴. Les mécanismes par lesquels la VKOR réduit la vitamine KO sont encore méconnus. Le groupe de Wallin *et al.* a proposé que la VKOR serait présente au sein de la membrane du RE sous forme de complexe enzymatique, complexe qui serait composé entre autres d'une protéine disulfide isomérase (PDI), une protéine thiorédoxine (Trx)-like présente à une concentration élevée dans le RE. La PDI jouerait en fait un rôle essentiel dans l'activité de la VKOR en fournissant les électrons nécessaires à la réduction de la vitamine KO²²⁵. Les résultats du groupe de Stafford *et al.* vont à l'encontre de cette hypothèse du complexe enzymatique, mais sont toutefois en accord avec le fait qu'une enzyme capable de réduire la forme disulfide de la VKOR en forme réduite doit être présente pour activer la VKOR²²².

Le groupe de Rapoport *et al.* a pour sa part éclairci la structure topologique de la VKOR en confirmant qu'elle possédait quatre passages transmembranaires²²⁶ au lieu de trois tel que proposé précédemment²²³, ce qui indique l'interaction avec une protéine redox du côté

luminal (Figure 27). De plus, ce groupe a identifié la protéine redox possiblement impliquée comme étant TMX, encore une fois une protéine thiorédoxine-*like* ancrée dans la membrane du RE. Dans ce scénario, la PDI serait aussi impliquée mais plutôt comme chaperonne.

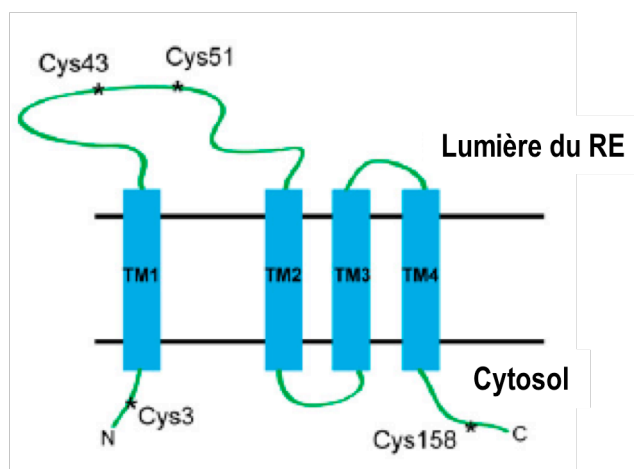


Figure 27: Topologie membranaire de la VKOR.

Adapté de ²²⁶.

Finalement, le groupe de Berkner *et al.* a suggéré un modèle pour expliquer la réduction de la VKOR et de la vitamine KO en vitamine KH₂¹⁸¹ (Figure 28). Le mécanisme proposé implique l'oxydation de thiols libres, situés au niveau des Cys132 et Cys135, en pont disulfure, libérant ainsi deux électrons et permettant l'interaction avec la vitamine K. Ces résidus sont situés dans la membrane du RE. La formation du pont disulfure inactive momentanément la VKOR, et une réaction de réduction doit se produire pour la réactiver, possiblement avec la protéine redox identifiée comme étant TMX. Une étude récente a démontré que les Cys43 et Cys51, situés du côté cytoplasmique, pourraient être la cible de cette protéine redox, et que la réduction du pont disulfide en thiols libres viendrait par la suite réduire le pont disulfide des Cys132 et 135, activant ainsi la VKOR¹⁸¹. L'importance des Cys43 et Cys51 était initialement méconnue. En effet, lors des essais enzymatiques *in vitro*, le dithiothréitol (DTT) est utilisé comme agent réducteur: comme cet agent pénètre les membranes lipidiques, son utilisation contournait la nécessité de la protéine redox endogène^{181,227}.

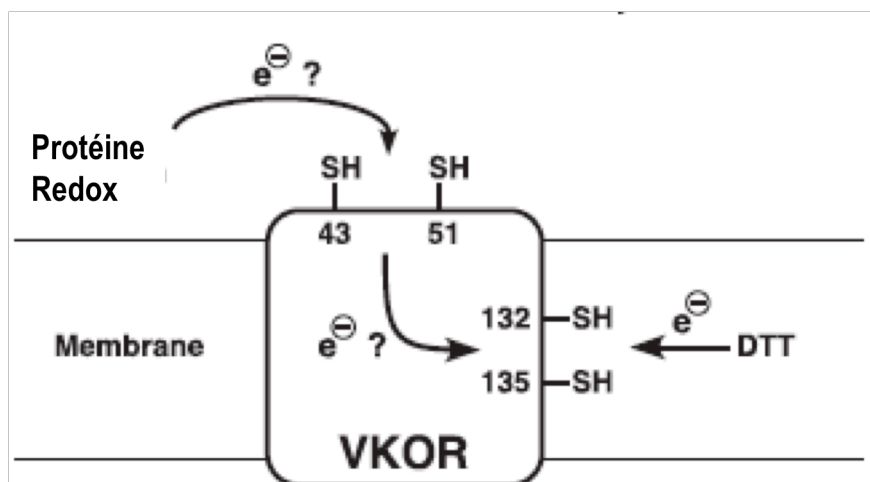


Figure 28: Mécanisme proposé pour expliquer le relais d'électrons nécessaire à l'activité de la VKOR.

Adapté de ¹⁸¹.

Le mécanisme par lequel la warfarine inhibe la VKOR est lui aussi encore inconnu. Par contre, il est établi que cette dernière inhibe la VKOR de façon non compétitive et irréversible, et qu'elle lie la forme oxydée de la VKOR^{228,229}. Ainsi, la warfarine lierait la VKOR dans le court laps de temps durant lequel soit les Cys132 et 135, ou encore les Cys43 et 51, sont oxydées.

L'étude d'une sous-population de rats résistants à la warfarine a permis de démontrer que ces rats présentent une activité VKOR réduite et requièrent des doses élevées de vitamine K pour éviter les hémorragies²³⁰. Il avait alors été suggéré que cette résistance pourrait être causée par des anomalies génétiques. Effectivement, des études ultérieures ont établi que des mutations dans le gène codant pour la VKOR étaient présentes chez ces animaux^{217,231}. Il est aussi suggéré que la résistance à la warfarine pourrait être attribuable à une protéine régulatrice de l'activité du système γ -carboxylase/VKOR, c'est-à-dire la caluménine²³². Sa surexpression au niveau hépatique protège en effet la VKOR de l'action de la warfarine²³³. Ainsi, la concentration de cette protéine dans le foie déterminerait le niveau de résistance à la warfarine. Toutefois, la caluménine est exprimée faiblement dans le foie humain, ce qui suscite un questionnement par rapport à la pertinence de ce mécanisme chez l'humain²³⁴. Il est

à noter qu'un polymorphisme spécifique à la caluménine a déjà été identifié dans une population d'afro-américains comme étant associé à la prise de doses élevées de warfarine²³⁵. Les mutations affectant la VKOR sont reconnues comme ayant plus d'impact que celles affectant le cytochrome P450 2C9, responsable du métabolisme de la warfarine²³⁶. Plusieurs mutations ont aussi été découvertes chez des patients résistants à la warfarine, et pourraient expliquer la grande variabilité dans les doses thérapeutiques nécessaires et par conséquent le risque accru d'hémorragies ou de thrombose associé à ce médicament lors de la phase d'initiation du traitement. Trois *single nucleotide polymorphisms* (SNP) en particulier affectant *VKORC1* sembleraient jouer un rôle majeur dans la détermination de la dose de warfarine nécessaire pour obtenir un effet anticoagulant^{237,238}, alors qu'une étude récente a même identifié un seul et unique SNP capable de prédire la variabilité des doses de warfarine nécessaires parmi tous les groupes raciaux²³⁹. De plus, une de ces mutations doublerait le risque de développer une maladie cardiovasculaire²⁴⁰. D'ailleurs, les rats résistants à la warfarine présentent un phénotype avec minéralisation de l'aorte et des artères rénales²⁴¹.

1.3.4.4. Mécanismes d'inhibition de la calcification par la MGP

Différents mécanismes sont proposés pour expliquer le rôle biologique de la MGP, c'est-à-dire son action inhibitrice sur la calcification extra-osseuse. D'abord, les résidus Gla de la MGP sont chargés négativement, ce qui leur permet de lier les ions calcium Ca^{2+} (Figure 29). Par cette liaison, la MGP libèrerait l'excès de calcium de la circulation, ou encore contribuerait à l'inhibition de la croissance des cristaux d'hydroxyapatite^{174,242}. Ces hypothèses sont en accord avec le fait que l'expression protéique de la MGP est détectée d'une part dans le plasma et d'autre part, aux sites de calcification²⁴³. Lors de la culture *in vitro* de CMLV aortiques de rat en présence de concentrations élevées de calcium, c'est-à-dire suffisantes pour induire une calcification, il a été démontré que l'expression de la MGP est augmentée²⁴⁴. De plus, il a été déterminé que la MGP circule dans le plasma sous forme de complexe avec la fétuine, et ce complexe agirait comme un transporteur de calcium et de phosphate²⁴⁵.

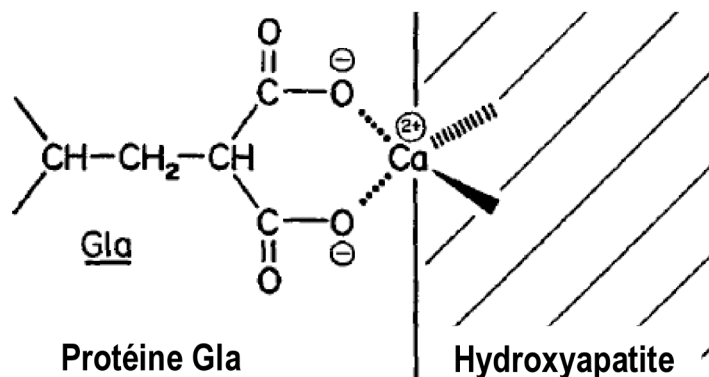


Figure 29: Liaison des résidus Gla au calcium de l'hydroxyapatite.

Adapté de ¹⁷⁴.

Le deuxième mécanisme proposé est celui par lequel la MGP inhiberait la différenciation des CMLV vers le phénotype *osteoblast-like*, soit en liant BMP-2 directement ou encore en agissant comme une protéine *noggin-like*, c'est-à-dire en empêchant BMP-2 d'interagir avec son récepteur²⁴⁶⁻²⁴⁸. Le ratio MGP/BMP-2 modulerait la différenciation ostéogénique²⁴⁷. En effet, des études de co-précipitation ont déterminé qu'un ratio de MGP/BMP-2 allant de 1 à 15 inhibait l'activité ALP dans un essai *in vitro*, alors que des ratios <1 ou >15 se traduisaient par une augmentation de l'activité ALP²⁴⁷. Il est à noter que c'est la forme active de la MGP, soit la forme γ -carboxylée, qui est en mesure de lier BMP-2^{248,249}. Ainsi, l'hypothèse veut que la MGP activée soit nécessaire aux CMLV pour conserver leur phénotype contractile²⁴³, et que la perte de fonctionnalité plutôt que la quantité de MGP serait un facteur déterminant du développement de la calcification¹²⁵.

Par contre, il a aussi été démontré que la région C-terminale de la MGP lie la vitronectine de façon indépendante de sa γ -carboxylation²⁵⁰. La vitronectine est une glycoprotéine présente dans la MEC des vaisseaux et elle est impliquée entre autres dans

l'adhésion cellulaire, notamment comme lien moléculaire entre les fibres élastiques et le collagène, et la coagulation. Sa liaison à la MGP pourrait résulter en une augmentation de la concentration de la MGP aux alentours des fibres élastiques, inhibant ainsi le développement de la calcification²⁵¹. D'ailleurs, les marquages immunohistologiques localisent la MGP aux environs des lamelles élastiques²⁵².

Finalement, il pourrait exister un lien entre l'apoptose des CMLV et la MGP. Tel que mentionné précédemment, l'apoptose joue un rôle dans le développement de la calcification en produisant des corps apoptotiques favorisant le développement de foyers de minéralisation. *In vitro*, les niveaux d'ARNm de la MGP sont augmentés lorsque la culture de CMLV contient des nodules formés de corps apoptotiques²⁵³, et l'expression protéique de la MGP est détectée dans les vésicules matricielles¹⁶¹. Il est suggéré que cette augmentation pourrait être liée à une boucle de rétroaction positive, lors de laquelle la détection par la cellule d'une accumulation de calcium induirait l'augmentation subséquente de la synthèse de MGP²⁵³. Il a aussi été démontré que la MGP inhibe l'activité de caspase-3 dans un modèle *in vitro* de calcification²⁵⁴.

1.3.4.5. Situations pathologiques liées à l'altération de la MGP

Chez la souris, la délétion du gène codant pour la MGP induit une calcification au niveau du cartilage et de la tunica média des vaisseaux, provoquant la mort environ 6 semaines après la naissance²⁵⁵. Chez l'humain, la délétion du gène est à l'origine du syndrome de Keutel, une maladie génétique rare caractérisée par une calcification cartilagineuse ectopique et par une calcification de l'arbre trachéobronchique²⁵⁶, mais sans calcification massive des vaisseaux sanguins²⁵⁷. Le groupe de *Price et al.* a démontré que l'administration de warfarine à des rats induisait une calcification artérielle médiale majeure, semblable au phénotype observé chez la souris MGP^{-/-}²⁵⁸. En effet, en inhibant le recyclage de la vitamine K, la warfarine empêche la γ -carboxylation de la MGP et cette dernière demeure donc inactive. Chez l'humain, il existerait une corrélation entre l'utilisation de warfarine, utilisé comme anticoagulant, et la calcification des valves aortiques¹⁶⁸. Ces situations pathologiques illustrent bien le rôle que semble jouer la MGP comme régulateur de la calcification extra-osseuse.

La MGP est détectée dans les plaques athéromateuses, et plus spécifiquement, la MGP non-carboxylée est retrouvée dans les régions calcifiées des plaques²⁵². L'expression de la MGP totale est augmentée dans les parois d'artères calcifiées et semble s'accumuler à ces sites de calcification²⁵⁸. D'autre part, dans les artères fémorales de patients diabétiques présentant de la calcification médiale, l'ARNm de la MGP est réduit¹³². De plus, il a été démontré que la présence de MGP non-carboxylée (*ucMGP*) co-localisait avec les sites de calcification médiale chez les patients diabétiques²⁵². Le lien entre le diabète et la MGP sera abordé plus en détails dans le Chapitre 5.

1.3.4.6. MGP circulante vs. tissulaire

En plus d'être exprimée localement dans une variété de tissus, la MGP est une protéine circulante, retrouvée à des concentrations variant entre 0.3 à 1 µg/mL selon l'espèce²⁴⁵. Par contre, il a récemment été proposé que la MGP circulante n'avait pas de fonction biologique. En effet, il a été démontré dans le cadre d'études transgéniques que la MGP produite par le foie et relâchée dans la circulation ne restaurait pas le phénotype de la souris MGP^{-/-}, alors que la MGP produite localement au sein des CMLV restaurait le phénotype de calcification artérielle chez ces souris²⁵⁹. Cette divergence pourrait expliquer que les concentrations plasmatiques de MGP ne corrélaient pas avec son activité biologique²⁶⁰. Ainsi, malgré le fait que la MGP puisse être synthétisée, γ -carboxylée puis relâchée dans la circulation, ces évidences semblent démontrer que pour remplir sa fonction de protéine anti-calcifiante, la MGP doit avoir été produite et γ -carboxylée localement.

Une étude récente a approfondi les rôles de la MGP et de l'OC dans la régulation de la minéralisation extra-osseuse à l'aide de la souris MGP^{-/-}, à nouveau pour tenter d'éclaircir le rôle de la MGP circulante²⁵⁹. Cette étude a démontré, grâce à la génération de transgènes, que la réintroduction de la MGP dans les CMLV rétablissait le phénotype normal au niveau artériel uniquement, sans qu'il n'y ait d'effet sur la minéralisation du cartilage, une caractéristique de la souris MGP^{-/-}. Par contre, la réintroduction systémique de MGP ne renversait pas le phénotype de calcification artérielle. Ce résultat démontre que la présence de

la MGP au niveau des CMLV, et non la MGP circulante, est essentielle pour inhiber la calcification artérielle. De façon similaire, lorsque la MGP était exprimée par les ostéoblastes, elle était en mesure d'inhiber la minéralisation osseuse, alors que lorsqu'elle est exprimée de façon systémique, elle n'y parvenait pas.

Cette démonstration n'exclut pas la possibilité que la MGP circulante puisse servir de biomarqueur, reflétant par exemple les niveaux de calcification vasculaire²⁵¹. Les concentrations de MGP dépendraient alors de la vitesse de synthèse dans le tissu vasculaire, de sa sécrétion et de sa liaison au site de calcification. Par contre, les modifications *post*-translationnelles que subit la MGP compliquent l'interprétation des résultats et la valeur prédictive de ces dosages, et la MGP totale n'est pas considérée comme un biomarqueur robuste non plus²⁶⁰. Par exemple, il a été démontré que les niveaux de MGP totale sont élevés chez les patients souffrant d'athérosclérose et chez ceux souffrant de diabète de type 1 (T1DM)²⁶¹, alors qu'ils sont plus faibles chez les patients présentant de la calcification des artères coronariennes²⁶². Les dosages pour la *ucMGP* ont démontré quant à eux que les personnes à risque de développer de la calcification artérielle avaient des concentrations plus élevées de *ucMGP*²⁶³, et que les concentrations de *ucMGP* étaient inversement proportionnelles à l'index d'augmentation aortique²⁶⁴.

La MGP mature est hautement insoluble et par conséquent, la façon dont elle circule n'est pas encore tout à fait claire. Dans le sérum des rats traités avec l'étidronate, un biphosphonate, la MGP a été isolée d'un complexe composé de fétuine, de calcium et de phosphate²⁴⁵. Suite à l'injection d'étidronate, les concentrations de MGP augmentent d'un facteur 36. Cette augmentation serait due à un taux de clairance diminué de la MGP plutôt qu'à une augmentation de la synthèse. Ce complexe de masse moléculaire > 250-300 kDa aurait le potentiel de prévenir la croissance, l'agrégation et la précipitation des cristaux d'hydroxyapatite. La warfarine inhibe l'augmentation des concentrations de MGP après le traitement à l'étidronate, indiquant que la γ -carboxylation de la MGP semble être requise pour sa liaison au complexe.

1.3.5. La vitamine K en lien avec la calcification vasculaire

La vitamine K a une seule fonction biologique connue: agir comme co-facteur dans la réaction de γ -carboxylation des résidus Glu¹⁹⁷. C'est une vitamine liposoluble qui existe sous différentes formes moléculaires ayant en commun un noyau naphthoquinone appelé ménadione, nécessaire au transfert d'électrons, mais qui varient selon la longueur et le degré de saturation de leur chaîne latérale aliphatique en position C-3²⁶⁵ (Figure 30). La phylloquinone (vitamine K1), synthétisée par les plantes photosynthétiques, possède une chaîne latérale phytyle contenant quatre résidus isoprénoides, dont un est insaturé. Les ménaquinones (vitamine K2; MK) possèdent quant à elles une chaîne latérale contenant un nombre variable de résidus isoprénoides insaturés allant de un à treize. Elles sont dénotées selon la formule MK-*n*, où *n* représente le nombre de ces résidus. Les ménaquinones sont synthétisées par les bactéries, notamment les bactéries intestinales²⁶⁶. Par contre, la contribution de la synthèse intestinale à l'apport en ménaquinones est considérée comme étant faible par rapport à l'apport fourni par la nourriture²⁶⁷. La MK-4 fait toutefois exception²⁶⁸. En effet, la MK-4 serait synthétisée au niveau des tissus à partir de la vitamine K1²⁶⁸⁻²⁷⁰ ou par la conversion de la ménadione présente dans la nourriture animale²⁷¹. La warfarine bloque toutefois cette conversion²⁷¹. La liposolubilité des différentes formes de vitamine K est proportionnelle à la longueur de la chaîne latérale¹⁹⁵. Une lipophilicité accrue confère à la ménaquinone une demi-vie prolongée²⁷².

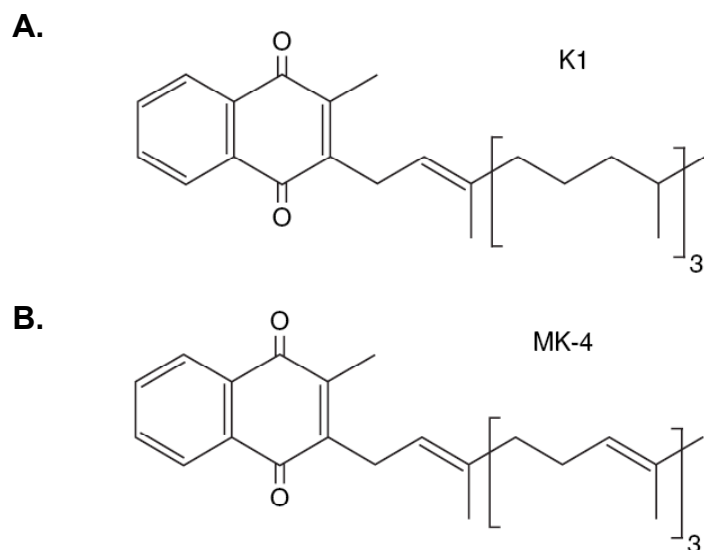


Figure 30: Différentes formes de la vitamine K.

(A) Phylloquinone et (B) Chaîne principale des ménaquinones. Adapté de ²⁰⁵.

1.3.5.1. Impact de la supplémentation en vitamine K

Suite à l'administration de vitamine K1 chez les rats, cette dernière s'accumule principalement au niveau du foie et du cœur. En contraste, l'accumulation de la MK-4 est plutôt observée dans les tissus extra hépatiques, y compris l'aorte^{268,269,273}. La distribution tissulaire de la vitamine K serait donc sélective. Ces constatations ont mené à l'hypothèse que la MK-4 pourrait être la forme privilégiée pour assurer les rôles de la vitamine K dans les tissus extrahépatiques²⁷³. Une étude a par la suite démontré que l'administration de MK-4 prévenait le développement de la calcification artérielle médiale chez des rats traités avec la warfarine, alors que la vitamine K1 n'avait pas d'effet sur la calcification dans ce modèle²⁷⁴. Il est proposé que cette divergence pourrait s'expliquer soit par les différences dans la biodisponibilité de chacune des formes de vitamine K, par des différences dans leur utilisation (évaluée par le ratio des concentrations quinones et époxydes), ou par une fonction encore inconnue de la chaîne géranylgeranyl de la MK-4²⁷⁴. Une seconde étude a démontré cette fois-ci la régression de la calcification artérielle médiale suite à l'administration de MK-4 et même

de doses élevées de vitamine K1 et ce, dans le même modèle animal¹⁸⁵. Curieusement, les concentrations de vitamine K sous forme de MK-4 et de MK-6 diminuent avec l'âge dans les tissus extrahépatiques²⁷⁵. Ces éléments suggèrent que la vitamine K, sous l'une ou l'autre de ses formes, pourrait être impliquée dans le développement de la calcification artérielle médiale ou pourrait contribuer à sa régression.

Des études ont aussi été conduites chez l'humain pour vérifier l'association entre la vitamine K et la calcification vasculaire. D'après les données recueillies auprès de la cohorte de l'étude Rotterdam, il a pu être établi qu'un apport accru en ménaquinones est associé à une réduction du risque de maladies coronariennes, de la mortalité associée aux maladies coronariennes ainsi que de la mortalité toutes causes confondues²⁷⁶. De plus, une relation inversement proportionnelle entre la présence de calcification aortique et l'apport en ménaquinones a été observée. Par contre, ces relations n'existent pas pour l'apport en vitamine K1²⁷⁶. La relation entre l'apport en ménaquinones et l'incidence de maladies coronariennes a aussi été observée dans une étude subséquente²⁷⁷. Dans une étude prospective cette fois, la supplémentation en vitamine K1 pour une durée de trois ans a ralenti la progression de la calcification des artères coronariennes, sans qu'il n'y ait de changement significatif dans les concentrations plasmatiques de MGP totale²⁷⁸. Une étude similaire a démontré l'effet bénéfique de la supplémentation en vitamine K1 sur l'élasticité de l'artère carotidienne commune chez les femmes *post*-ménopausées²⁷⁹. Il semblerait donc que la vitamine puisse avoir une influence au niveau vasculaire.

1.3.5.2. Impact de la vitamine K *in vitro*

Un lien entre la vitamine K et la calcification a pu être établi *in vitro* avec des CMLV. Dans un modèle de calcification induite par des concentrations élevées de Ca²⁺ (sous forme de CaCl₂), l'incubation concomitante avec de la vitamine K1 a prévenu le développement de la calcification, alors que la présence de warfarine l'a augmenté²⁸⁰. De même, la présence de vitamine K1 a résulté en une diminution des quantités de *ucMGP*, alors que la warfarine a eu l'effet contraire. Dans un modèle semblable, il a aussi été démontré que la vitamine K2

inhibait la calcification de façon dépendante de la dose²⁸¹. Cette inhibition est synergique lorsque la vitamine K2 est mise en présence de pamidronate, un biphosphonate²⁸¹. Finalement, l'incubation de CMLV avec de la vitamine K2 a été associée à une modulation de l'expression de différents gènes, notamment une diminution de l'expression du gène codant pour l'OPG, une protéine impliquée dans le métabolisme osseux²⁸².

1.3.6. Interaction entre la MGP et la vitamine D

Tel que mentionné plus haut, l'administration de vitamine D induit le développement de la calcification vasculaire dans les modèles animaux. Cet effet est aussi observé *in vitro*, lorsque des CMLV sont mises en culture avec de la vitamine D, un effet jumelé à une augmentation de l'activité de l'ALP¹⁶⁵. Ces résultats suggèrent que la calcification vasculaire amenée par l'administration de doses élevées de vitamine D pourrait non seulement être liée à l'augmentation des concentrations sériques de calcium, mais pourrait aussi impliquer la MGP. En effet, le gène codant pour la MGP posséderait des séquences servant de site de liaison pour la vitamine D²⁸³. Ainsi, une étude a établi que des niveaux physiologiques de vitamine D augmentaient la transcription de la MGP dans les CMLV²⁸³. Il a aussi été démontré que la vitamine D augmente l'expression de l'ARNm de la MGP dans les ostéoclastes humains, et chez le rat, augmente son expression dans les chondrocytes et les ostéoblastes²⁴³. De plus, l'administration la vitamine D chez les rats augmente les niveaux sériques de MGP comparativement aux rats contrôles¹³⁸.

En contraste, l'étude de Price *et al.* a mis en évidence le fait que chez les rats à qui est administré de la vitamine D, l'expression de la MGP n'est pas modifiée au niveau artériel avant l'établissement de la calcification, supportant l'hypothèse opposée voulant que la vitamine D ne serait pas impliquée dans le développement de la calcification par l'intermédiaire de sa modulation de l'expression de la MGP²⁸⁴.

Les autres gènes dont l'expression est influencée par la liaison de la vitamine D à son récepteur incluent les gènes codant pour VEGF, MMP-9, l'élastine et le collagène¹¹⁹. La

modulation de ces protéines de structure pourrait éventuellement contribuer à augmenter la rigidité vasculaire.

De façon intéressante, il a été démontré que l'expression de l'ARNm de la γ -carboxylase était augmenté dans les ostéoblastes humains après un pré-traitement avec de la vitamine D²⁸⁵, et que l'activité de la γ -carboxylase était augmentée *in vivo* au niveau rénal chez des rats après un traitement à la vitamine D²⁸⁶.

1.3.7. Paradoxe ostéoporose/calcification vasculaire

La présence d'ostéoporose est souvent observée en concomitance avec la calcification vasculaire. Plus spécifiquement, un faible indice de densité osseuse a été associé à plusieurs reprises à la présence de calcification vasculaire, et la sévérité de la calcification vasculaire est associée à une augmentation du risque de fracture²⁸⁷. Cette association est d'autant plus marquée chez les femmes ménopausées^{288,289}. Dans le modèle MGP *-/-*, la formation osseuse est également affectée, en plus de la présence de calcification vasculaire massive²⁵⁵. Une hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène est que lors de la résorption osseuse, des cristaux d'hydroxyapatite sont libérés dans la circulation, cristaux qui par la suite viennent contribuer au développement de la calcification au niveau artériel¹³⁸.

1.3.7.1. L'ostéocalcine

L'OC est une protéine VKD, qui subit une γ -carboxylation aux résidus en position 17, 21 et 24. Cette modification *post*-translationnelle lui confère une plus grande affinité pour les ions calcium et l'hydroxyapatite²⁹⁰, tel que c'est le cas pour la MGP. L'OC est exprimée dans les ostéoblastes et les odontoblastes uniquement²⁹¹. Elle est l'une des trois protéines VKD produites par les ostéoblastes, les deux autres étant la MGP et la Protéine S. L'OC est synthétisée en tant que pré-promolécule, puis relâchée dans la circulation²⁹². Les études de fonctionnalité ont démontré une augmentation marquée de la formation osseuse chez la souris *knockout* Ost*-/-*, suggérant qu'elle pourrait avoir un rôle dans la régulation de la fonction

ostéoblastique²⁹³. L'intérêt de l'OC réside dans la possibilité d'utiliser les mesures de sa concentration sérique comme marqueur de la formation osseuse, un outil qui a été validé par l'utilisation de marqueurs traditionnels. Ainsi, chez les femmes ménopausées, une corrélation significative a pu être établie entre les concentrations sériques d'OC et le taux de formation osseuse²⁹⁴. Les concentrations d'OC circulante représenteraient en fait la fraction de l'OC qui n'a pas été adsorbée sur l'hydroxyapatite.

L'intérêt des mesures de concentrations de l'OC dans le cadre notre l'étude portant sur la MGP repose sur le fait que des essais commerciaux sont disponibles pour évaluer de façon distincte les concentrations d'OC γ -carboxylée, non-carboxylée et totale, ce qui n'est pas le cas pour la MGP. De plus, les concentrations d'OC non-carboxylées, ainsi que le ratio *ucOC/cOC*, sont considérées comme étant des mesures d'évaluation du statut de vitamine K²⁹⁵⁻²⁹⁹. Ainsi, une augmentation du ratio *ucOC/cOC* serait indicateur d'un statut en vitamine K faible³⁰⁰.

1.3.8. Options thérapeutiques pour le traitement de la calcification vasculaire

Le bref aperçu du lien entre les désordres du métabolisme osseux et la calcification vasculaire énoncé ci-haut constitue une problématique lors de la mise au point de thérapies pour le traitement de la calcification artérielle médiale. En effet, la calcification artérielle étant un mécanisme régulé de minéralisation, un traitement pharmacologique ciblant une composante du métabolisme osseux et visant la régression de la calcification artérielle aura probablement un effet simultané au niveau des os, effet la plupart du temps néfaste. Cet élément complique le développement de thérapies adéquates pour le traitement de la calcification artérielle. De plus, la déminéralisation d'une structure est en soi un réel défi, et c'est pourquoi les thérapies visent le plus souvent à prévenir la progression de la calcification artérielle plutôt que sa régression. Les thérapies actuelles sont généralement des traitements utilisés pour le traitement de maladies apparentées, telles que l'ostéoporose, les maladies rénales, et les maladies cardiovasculaires. Voici quelques exemples de composantes de l'arsenal thérapeutique disponible actuellement.

1.3.8.1. Bisphosphonates

Les bisphosphonates sont des analogues du pyrophosphate, un inhibiteur endogène de la calcification. Toutefois, le pyrophosphate est hydrolysé rapidement *in vivo*. Cette caractéristique a mené au développement d'analogues non-hydrolysables comme les bisphosphonates. Leur mécanisme d'action repose sur leur capacité à se lier à l'hydroxyapatite et à inhiber la résorption osseuse ostéoclastique³⁰¹. Leur utilité primaire est pour le traitement de l'ostéoporose. Pour ce qui est de la calcification artérielle, il a été démontré que l'administration de bisphosphonate prévient le développement de la calcification artérielle induite par des doses élevées de vitamine D chez le rat³⁰². Toutefois, cette efficacité n'a pu être démontrée sans équivoque chez l'humain^{303,304}. Des études cliniques supplémentaires sont en cours pour évaluer de façon plus précise les bénéfices accordés par cette thérapie au niveau vasculaire.

1.3.8.2. Médicaments chélateurs du phosphate

Des médicaments chélateurs du phosphate au niveau du système digestif sont souvent utilisés chez les patients souffrant de maladie rénale. Ils sont utilisés pour contourner l'incapacité des reins à filtrer le phosphate en excès, avec l'objectif d'empêcher son accumulation. Cette médication est surtout employée chez les patients en dialyse, chez qui les reins sont incapables de maintenir une concentration adéquate de phosphate dans le sang, conduisant ultimement au développement de la calcification. Il existe deux types de médicaments chélateurs du phosphate, soit ceux contenant du calcium et ceux n'en contenant pas. Alors que ceux qui contiennent du calcium contribuent au développement et à la progression de la calcification artérielle, ce sont ceux n'en contenant pas qui sont reconnus pour diminuer sa progression³⁰⁵.

1.3.8.3. Thiosulfate

Le thiosulfate de sodium est une petite molécule capable d'interagir avec le calcium pour former des paires d'ions. Cette interaction est considérée comme étant trop faible pour avoir un impact significatif sur les réactions dépendantes du calcium à des doses cliniques³⁰⁶. Sa liaison au calcium mène à la formation du thiosulfate de calcium, qui sera ensuite excrété. Son usage permet une réduction de la calcification lorsqu'utilisé pour le traitement de l'artériolopathie urémique calcifiante³⁰⁷. Les mécanismes d'action permettant une telle réduction ne sont toutefois pas élucidés³⁰⁶. Dans un modèle de rat urémique, l'administration de thiosulfate de sodium prévient la calcification vasculaire³⁰⁸. Par contre, cet effet s'accompagne d'une diminution de la densité osseuse.

1.3.8.4. Antagonistes du récepteur à l'endothéline

Les antagonistes du récepteur à l'endothéline (ET) sont utilisés pour le traitement de l'hypertension. L'implication de l'ET dans la calcification vasculaire a été mise en évidence dans le modèle de calcification *in vivo* vitamine D/nicotine (VDN). Dans ce modèle, l'expression aortique du gène codant pour l'ET est augmentée par rapport au groupe contrôle, de même que les niveaux plasmatiques d'ET. Cet effet est contré par l'administration concomitante de bosentan, un antagoniste du récepteur à l'ET³⁰⁹. Un traitement avec le darusentan, un autre antagoniste du récepteur à l'ET, induit une régression de la calcification artérielle médiale dans le modèle WVK³¹⁰. Un des mécanismes avancé pour expliquer cette régression est que l'inhibition de la signalisation induite par la liaison de l'ET à son récepteur induit l'expression de l'anhydrase carbonique, permettant ainsi une modification du pH extracellulaire et par conséquent, une dissolution des cristaux d'hydroxyapatite³¹¹. Des études chez l'humain seraient nécessaires pour confirmer cette propriété.

1.3.8.5. Denosumab

Le denosumab est un anticorps monoclonal humain dirigé contre RANKL, empêchant ainsi la liaison de RANK à son récepteur. Il est approuvé pour le traitement de l'ostéoporose. Étant donné le potentiel du denosumab à bloquer la calcification des CMLV médiée par RANKL, il a été étudié dans un modèle murin de calcification vasculaire/ostéoporose induite par l'administration de glucocorticoïdes, où il a effectivement réduit la déposition de calcium au niveau de l'aorte³¹². Par contre, le potentiel du denosumab à participer au traitement de la calcification artérielle médiale reste encore à déterminer.

1.3.8.6. Bloqueurs de canaux calciques

Les bloqueurs de canaux calciques semblent efficaces pour réduire la déposition de calcium dans divers modèles de calcification, comme les modèles VDN³¹³ et WVK³¹⁴. Cet effet a également été démontré dans une cohorte de patients hypertendus, chez qui l'administration de nifédipine a ralenti la progression de la calcification des artères coronariennes³¹⁵.

1.3.8.7. Inhibiteurs de la voie de l'angiotensine

L'administration de périndopril a diminué la calcification aortique dans un modèle de rats avec maladie kystique rénale comparativement aux rats contrôles³¹⁶. Dans un modèle de lapins avec calcification artérielle induite par diète athérogénique et supplémentation en vitamine D, l'administration d'un antagoniste du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AngII) a prévenu le développement de la calcification et l'augmentation de l'expression de marqueurs ostéogéniques comme BMP-2³¹⁷.

1.3.9. Modèles animaux présentant de la calcification artérielle médiale

Afin d'élucider les mécanismes impliqués dans le développement de la rigidité artérielle amenée en partie par la calcification artérielle médiale, différents modèles animaux peuvent être utilisés. Par contre, leur nombre est très limité étant donné la difficulté à recréer la situation pathologique observée chez l'humain.

1.3.9.1. Modèles chez le rat

1.3.9.1.1. *Modèle de vieillissement*

La première option est d'utiliser des animaux âgés, en supposant que l'évolution des composantes pathologiques menant à la rigidité vasculaire suit un cours semblable chez ces animaux que chez l'humain, mais simplement sur une plus courte période. À cet effet, il a été mis en évidence que la rigidité artérielle augmente progressivement avec l'âge chez le rat normotendu³¹⁸ (Figure 31). Les changements dans les proportions des composantes de la paroi vasculaires seraient toutefois mineurs, suggérant que la glycation des protéines de la matrice ainsi que la calcification des lamelles élastiques pourraient être impliquées^{100,318}. En effet, la quantité de calcium au niveau de l'aorte thoracique est pratiquement doublée chez les rats âgés³¹⁸. La présence d'HSI n'a toutefois pas pu être démontrée chez les rats âgés. Ces changements surviennent sans modification de la PAM et en absence d'athérome.

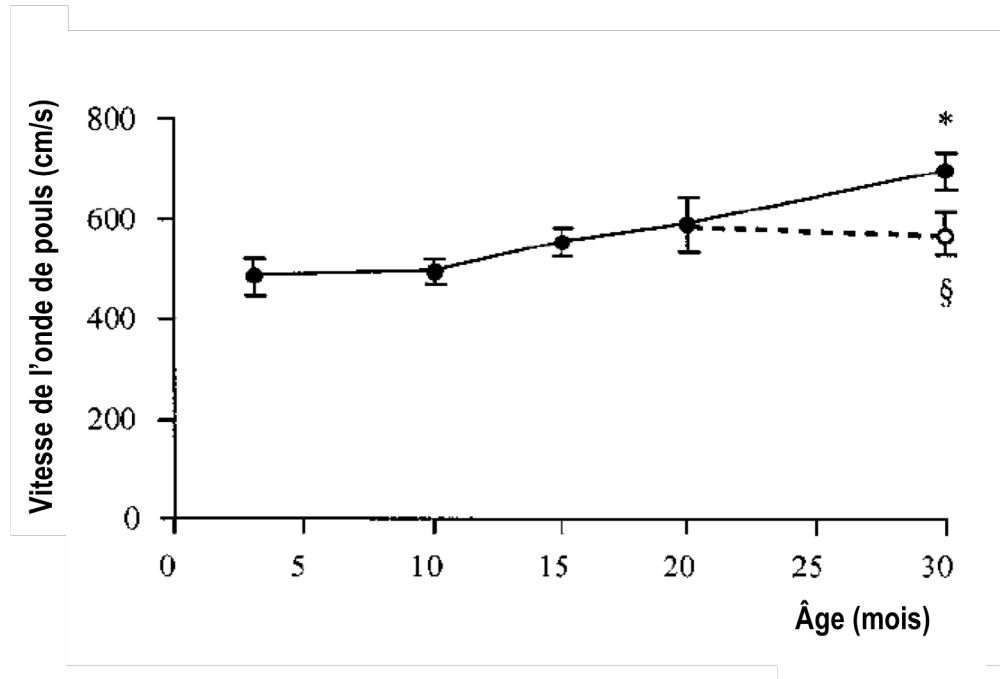


Figure 31: Augmentation de la vitesse de l'onde de pouls en fonction de l'âge chez le rat normotendu.

Adapté de ³¹⁸.

Une difficulté évidente de ce type de modèle est la durée nécessaire pour que les modifications associées au vieillissement surviennent. Ces changements s'observent vers l'âge de 30 mois environ. Afin de contourner cette difficulté et d'obtenir un modèle présentant les caractéristiques recherchées mais à un âge plus précoce, différentes méthodes sont employées. Dans le cas qui nous intéresse, la calcification artérielle médiale est évidemment la caractéristique recherchée.

1.3.9.1.2. Application de chlorure de calcium

L'application d'une solution de CaCl_2 directement sur le tissu adventiciel aortique d'un rat anesthésié permet d'induire une calcification des lamelles élastiques³¹⁹. Cette calcification s'accompagne d'une dégradation des fibres élastiques, d'une désorganisation de la MEC et de

l'apoptose des CMLV. Différentes concentrations de CaCl_2 peuvent être utilisées, et même avec une faible concentration³¹⁹, c'est-à-dire plus faible que celles décrites initialement³²⁰, il est possible d'obtenir des caractéristiques associées à l'élastocalcinose de Mönckerberg, soit une dégradation de l'élastine et une calcification modérée des fibres élastiques.

1.3.9.1.3. Vitamine D

L'administration de vitamine D à des rats, avec ou sans l'ajout de nicotine, induit une calcification artérielle médiale³²¹. La vitamine D provoque une surcharge de calcium, alors que la nicotine agit comme un stimulus pour l'élastinolyse³²². Une fragmentation du réseau élastique est aussi observée, accompagnée d'une diminution de la compliance aortique et par conséquent, d'une augmentation de la VOP. Une augmentation de la pression systolique est aussi observée, sans changement de la PAM.

1.3.9.1.4. Warfarine/vitamine K

Le modèle WVK se base sur la propriété qu'a la warfarine d'inhiber le recyclage de la vitamine K, de sa forme époxyde à sa forme hydroquinone, c'est-à-dire réduite. Comme c'est la forme réduite que la γ -carboxylase utilise pour carboxyler les résidus Glu, la réaction de γ -carboxylation est par conséquent inhibée. Cette inhibition touche en théorie toutes les protéines requérant cette modification *post*-translationnelle, incluant les protéines responsables de la coagulation. Or, l'ajout de vitamine K au traitement permet de restaurer la γ -carboxylation de façon préférentielle au niveau hépatique, assurant la fonctionnalité des facteurs de coagulation et évitant ainsi les risques d'hémorragies. L'induction de la calcification médiale serait donc la conséquence de l'inhibition de la γ -carboxylation de la MGP^{258,323}. De plus, le contenu en élastine est réduit, la VOP est augmentée, et les rats souffrent d'HSI³²³.

1.3.9.2. Modèles chez la souris

Quelques modèles sont abordés en détails ci-bas, alors que le Tableau III fournit une liste non-exhaustive des modèles murins disponibles ainsi que leur phénotype.

1.3.9.2.1. *Souris MGP -/-*

Ce modèle a été mentionné précédemment pour démontrer l'implication de la MGP dans la calcification vasculaire. Les souris déficientes en MGP se développent jusqu'à terme mais meurent vers l'âge de deux mois suite à la rupture de l'aorte thoracique ou abdominale due à sa calcification²⁵⁵. Le désordre de calcification est aussi observé au niveau du cartilage, ce qui résulte en une stature plus petite, en une baisse de la densité osseuse, ainsi qu'en des fractures. La calcification affecte les artères élastiques et musculaires, sans toucher les artérioles, les capillaires ou les veines. Les artères coronaires et les valves aortiques sont aussi touchées par la calcification, mais sans qu'il n'y ait présence de plaque athérosclérotique. Les artères affectées contiennent des cellules avec des caractéristiques chondrocytiques, et des vésicules matricielles sont retrouvées à proximité des chondrocytes. Le phénotype de la souris MGP -/- rappelle celui d'une maladie rare retrouvée chez l'humain, c'est-à-dire le syndrome Singleton-Merten.

1.3.9.2.2. *Souris OPG -/-*

La souris OPG-/- est un modèle mettant en évidence le paradoxe ostéoporose/calcification vasculaire. En effet, cette souris développe une calcification médiale présente surtout au niveau de l'aorte et des artères rénales, tout en ayant une réduction importante de la densité osseuse¹⁴⁵.

1.3.9.2.3. *Souris Anhydrase Carbonique II -/-*

Les souris déficientes en anhydrase carbonique II développent une calcification médiale dans les petites artères et les artéριοles³²⁴. Cette calcification est dépendante de l'âge.

Gène	Modèle murin	Phénotype
Anhydrase carbonique II	Car2 ^{-/-}	Ostéopétrose, calcification des petites artères et des artéριοles (de façon plus marquée au niveau rénal)
Fétuine	Fetuin ^{-/-}	Calcification vasculaire et des tissus mous
Fibriline-1	FBN1 ^{-/-}	Calcification artérielle médiale, anévrismes aortiques
β-Glucosidase	Klotho ^{-/-}	Vieillissement, calcification vasculaire
MGP	MGP ^{-/-}	Calcification vasculaire, valvulaire et cartilagineuse
OPN	OPN ^{-/-} / MGP ^{-/-}	Augmentation de la calcification artérielle médiale
OPG	OPG ^{-/-}	Ostéoporose, calcification vasculaire
PC-1	ttw (<i>tiptoe walking</i>)	Calcification vasculaire et cartilagineuse
Smad6	Madh6 mutant	Calcification aortique

Tableau III: Modèles murins de calcification vasculaire.

Adapté de ¹¹⁸.

1.4. Le diabète et le vieillissement vasculaire

1.4.1. Accélération de la rigidité artérielle

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de décès chez les patients diabétiques^{325,326}. Il est suggéré que l'augmentation de la rigidité artérielle serait en partie responsable pour cette augmentation du risque cardiovasculaire. En effet, le diabète accélère le

développement de la rigidité artérielle, que ce soit le T1DM³²⁷⁻³²⁹ ou de type 2³³⁰. Cette augmentation de la rigidité artérielle survient avant même que des complications micro- ou macrovasculaires ne soient détectables cliniquement³³¹.

Cette accélération de la rigidité artérielle est mise en évidence par l'augmentation prématurée de la pression pulsée, survenant près de 15 plus tôt chez les patients diabétiques comparativement aux patients contrôles³³² (Figure 32). Cette différence suggère que les caractéristiques des artères de patients souffrant de diabète reflètent un âge beaucoup plus avancé que leur âge chronologique ne le laisse supposer³³³.

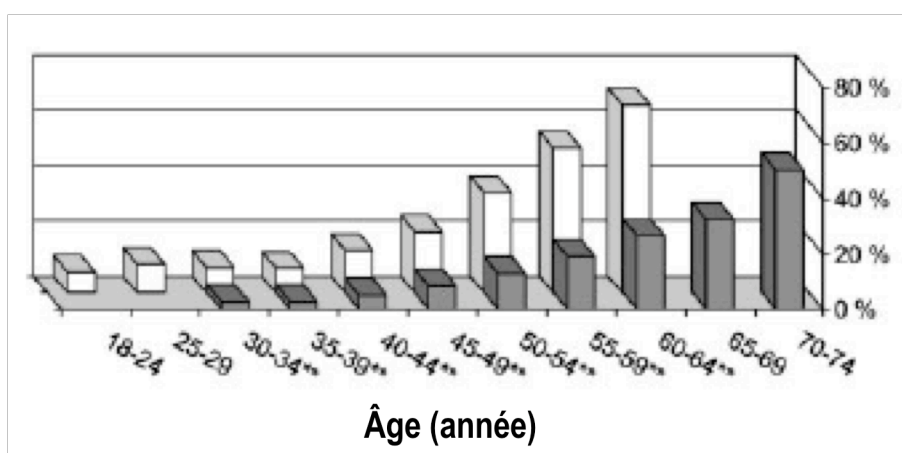


Figure 32: Prévalence de l'hypertension systolique isolée chez les patients diabétiques comparativement aux patients contrôles.

Ce graphique met en évidence le fait que la prévalence de 20% est observable dans la tranche d'âge 60-64 ans chez les sujets non-diabétiques, alors qu'elle survient 15 ans plus tôt, dans la tranche d'âge 45-49 ans, chez les sujets diabétiques. Adapté de³³².

L'augmentation précoce de la rigidité vasculaire est partie intégrante du concept d'accélération du vieillissement vasculaire, dont le diabète est un facteur de risque majeur³³⁴ (Figure 33). Il est suggéré que l'évaluation de la rigidité vasculaire est la façon la plus appropriée pour rendre compte de l'accumulation des dommages à la paroi vasculaire, en contraste avec les biomarqueurs traditionnels, comme la glycémie ou les taux de cholestérol,

qui eux subissent davantage de fluctuations et par conséquent ne fournissent de l'information que pour une fenêtre de temps précise³³⁵.

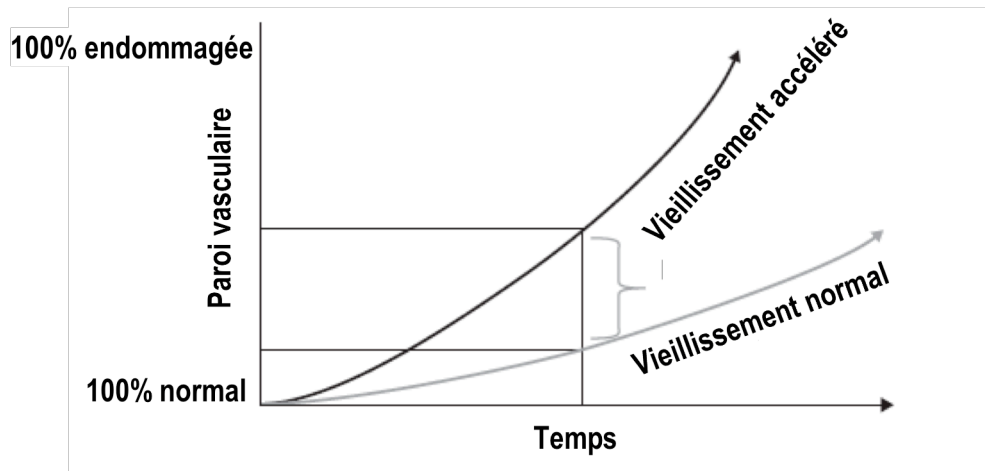


Figure 33: Comparaison des courbes de vieillissement pour un vaisseau normal comparativement à un vaisseau âgé.

Adapté de ³³⁴.

La calcification artérielle médiale est une composante pathologique fréquemment observée chez les patients diabétiques^{330,336,337}. Étant donné qu'elle contribue au développement de la rigidité artérielle, nous avons choisi de nous y attarder dans le cadre de ce projet.

1.4.2. Mécanismes cellulaires à l'origine de la calcification précoce des vaisseaux en présence d'hyperglycémie

En plus des mécanismes identifiés précédemment, certains éléments spécifiques au diabète ont été suggérés comme pouvant être des facteurs contribuant au développement de la calcification artérielle médiale précoce. Les mécanismes menant à cette calcification précoce sont complexes et encore peu connus pour le moment³³⁸, et l'étude et la compréhension de ces mécanismes sont essentielles afin de pouvoir proposer des solutions thérapeutiques qui

permettront de contrer l'augmentation de la mortalité et la morbidité cardiovasculaire associées à la calcification vasculaire chez cette population³³⁹.

1.4.2.1. Changements phénotypiques des cellules de muscle lisse vasculaire

Plusieurs indices suggèrent que la voie de signalisation BMP est altérée au niveau vasculaire en présence d'hyperglycémie. Le diabète provoque un stress oxydant et inflammatoire au niveau adventiciel, ce qui contribue à l'augmentation de l'expression de BMP2/4 dans les péricytes vasculaires¹⁵³. De même, il a été rapporté que la présence de AGEs induit la différenciation ostéoblastique des péricytes microvasculaires³⁴⁰. Le diabète augmente aussi l'expression aortique de Msx1 et Msx2^{155,341}. La production de BMP2/4 induit alors la voie de signalisation Msx2-Wnt (Figure 34). TNF- α et une pression intravasculaire élevée sont aussi des facteurs reconnus pour augmenter l'expression de BMP2 dans les cellules endothéliales et les péricytes^{153,342}. TNF- α promeut aussi la calcification *in vitro* via la voie de l'AMP cyclique³⁴³. Ainsi, le diabète module à la hausse la régulation de la voie ostéogénique BMP-2-Msx2 au niveau adventiciel, ce qui contribue au développement de la calcification vasculaire.³⁴⁴

Le lien entre l'hyperglycémie et la calcification a aussi été démontré *in vitro*. Par exemple, la culture de CMLV bovines en présence d'une concentration élevée de glucose, similaire à celle retrouvée chez des patients diabétiques, résulte en une augmentation du contenu calcique, jumelée à une augmentation de la sécrétion de BMP-2, de l'expression de Runx2 et de l'OC, ainsi que de l'activité ALP³⁴⁵.

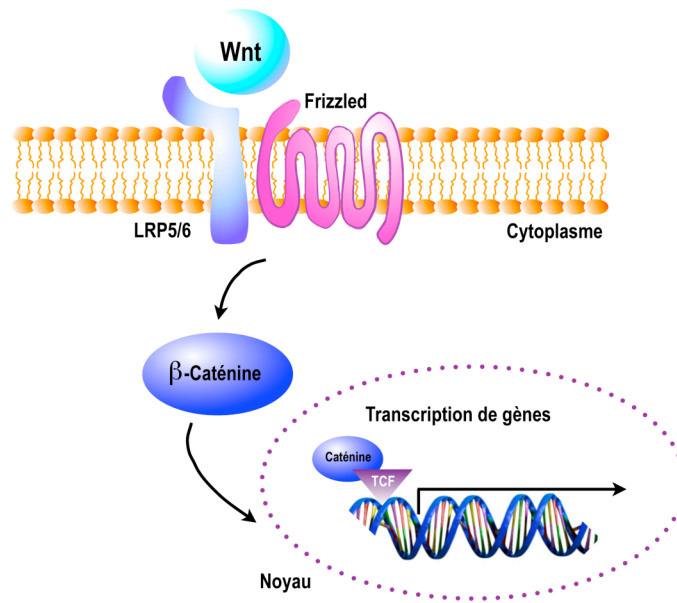


Figure 34: Voie de signalisation Wnt.

Adapté de ³⁴⁶.

1.4.2.2. Augmentation de l'expression de l'ostéopontine

L'hyperglycémie induit l'expression de l'OPN dans des cultures de cellules de muscle lisse aortique³⁴⁷, une induction qui est aussi observée dans les artères diabétiques en présence de calcification médiale^{345,348} et dans les artères carotidiennes de rats souffrant de T1DM suite à l'injection de streptozotocine³⁴⁸. Son expression reflèterait une différenciation ostéogénique. La présence d'OPN n'est pas détectée dans des artères saines. L'augmentation de l'expression de l'OPN dans les vaisseaux diabétiques entraîne la migration et la prolifération des myofibroblastes adventitiels, l'épaississement de la média et le renouvellement de la MEC dépendant des métalloprotéinases¹¹⁵. Ces résultats sont surprenants, puisque l'OPN est reconnue comme étant un inhibiteur inductible de la calcification *in vivo*, une inhibition qui dépendrait de son état de phosphorylation³⁴⁹. La souris OPN^{-/-} ne développe toutefois pas de calcification, par opposition à la souris OPN^{-/-}MGP^{-/-} qui elle présente un développement accéléré du phénotype de calcification vasculaire comparativement à la souris OPN^{+/+}MGP^{-/-}

³⁵⁰. L'hypothèse avancée est qu'il est possible qu'une forme clivée de l'OPN puisse jouer un rôle différent^{133,172,351} que sa forme phosphorylée. Son implication précise dans le développement de la calcification vasculaire associée au diabète requiera donc davantage de recherche.

1.4.2.3. AGEs

Les produits avancés de glycation sont le résultat de la réaction de Maillard. Cette réaction consiste en la glycation non-enzymatique de protéines, c'est-à-dire en la fixation irréversible du glucose sur les fonctions amines des protéines. Cette fixation modifie la structure et la fonction des protéines. D'autre part, les AGEs, en se liant à leur récepteur (RAGE), activent des voies de signalisation qui induisent un stress oxydant et un état pro-inflammatoire. Les AGEs se retrouvent dans le plasma et les tissus, par exemple les artères, la peau et les reins, et leur présence augmente avec l'âge^{352,353}. Les AGEs sont formés à une vitesse accélérée en présence de diabète³⁵⁴. L'altération du catabolisme des protéines durant le vieillissement et le diabète contribue aussi à l'accumulation des AGEs. En effet, la glycation des protéines impliquées dans le catabolisme des protéines endommagées diminue leur activité protéolytique, et la glycation des protéines augmente leur résistance à la digestion enzymatique^{355,356}.

Ainsi, les AGEs sont associés au vieillissement physiologique et aux complications de maladies chroniques, notamment le diabète. Par exemple, il existe une corrélation positive entre les concentrations de AGEs circulantes et la calcification des artères coronariennes chez les patients dialysés³⁵⁷. L'accumulation de AGEs est aussi observée aux sites de calcification de valves aortiques³⁵⁸. Dans un modèle *in vivo* de calcification artérielle médiale en présence de diabète, induit par l'administration de STZ et de vitamine D, les niveaux de AGEs aortiques sont augmentés significativement de même que l'expression de RAGE par rapport aux rats contrôles³⁵⁹. Des études *in vitro* ont aussi démontré que les AGEs induisent la calcification des CMLV en induisant la différenciation ostéoblastique des CMLV *via* la voie signalétique RAGE/p38³⁶⁰. De plus, l'incubation de CMLV avec des AGEs conduit à l'augmentation de

l'expression de RAGE, de l'OPN et de l'ALP, en plus d'augmenter le contenu calcique de façon dépendante du temps et des concentrations, un effet partiellement bloqué par l'incubation concomitante d'un anticorps dirigé contre RAGE³⁶¹.

1.4.3. Implication possible de la MGP

Est-ce que dans le contexte du diabète, la MGP pourrait jouer un rôle dans l'accélération de la rigidité vasculaire en contribuant au développement précoce de la calcification artérielle médiale? Certaines évidences suggèrent que cette hypothèse est plausible. D'abord, il a été démontré que l'expression de l'ARNm codant pour la MGP totale était diminuée significativement dans la média des artères fémorales de patients diabétiques présentant de la calcification médiale¹³². D'autre part, dans une sous-population de CMLV adjacentes aux sites de calcification, l'expression de la MGP est très élevée^{132,252}. Dans les CMLV cultivées *in vitro* pour une durée de 30 jours, l'expression de l'ARNm codant pour la MGP est augmentée au même moment où la formation d'hydroxyapatite est détectée²⁵³. Ces observations ont mené à l'hypothèse qu'une réduction de la MGP pourrait favoriser le développement de la calcification, et que l'augmentation de l'expression pourrait quant à elle être transitoire et refléter une tentative de contrer le développement de la calcification ou l'accumulation d'un complexe MGP/Ca²⁺ incapable de quitter la paroi vasculaire³⁶².

Il a aussi été suggéré que la MGP présente pourrait être dysfonctionnelle, peut-être dû au fait que la γ -carboxylase et les niveaux de vitamine K seraient altérés avec l'âge^{192,209}. Dans la média d'artères périphériques de patients diabétiques, l'expression de la *ucMGP* est détectée en abondance, en plus de co-localiser avec la calcification²⁶⁴, ce qui supporte cette suggestion.

Il a également été démontré que les concentrations plasmatiques de MGP totales étaient augmentées chez les patients diabétiques comparativement aux sujets contrôles^{261,363}. De plus, les concentrations sériques de *ucMGP* sont fortement associées à la calcification de la valve mitrale: une concentration élevée de *ucMGP* augmente la probabilité de calcification³⁶⁴. Par contre, tel que mentionné précédemment, la MGP circulante ne semble pas avoir de

fonction biologique alors il est difficile d'interpréter ces différences. Une fois de plus, ces concentrations pourraient à tout le moins servir de biomarqueur.

Le groupe de Boström *et al.* a obtenu des résultats très intéressants par rapport à l'implication de la MGP dans la calcification vasculaire associée au diabète³⁶⁵. Dans un modèle de souris de T1DM, la souris *Ins2^{Akita/+}*, ils ont démontré que l'expression aortique de la MGP est augmentée, tout comme celle de BMP-2 et BMP-4. Ce résultat est observé également dans d'autres modèles de diabète, notamment la souris *db/db*, qui développe un diabète de type 2 (T2DM), et le rat HIP, qui est aussi un modèle de T2DM. De plus, la phosphorylation de Smad 1/5/8 est augmentée au niveau de la paroi vasculaire pour ces trois modèles, démontrant l'activation de la voie BMP dans le diabète. De façon concomitante, l'expression des marqueurs ostéogéniques Runx2 et osterix, ainsi que de l'OPN est aussi augmentée, parallèlement à une augmentation de la calcification aortique au niveau des lamelles élastiques, sans que les concentrations de phosphate ne soient modifiées. En générant un transgène *MGP^{tg/wt},Ins2^{Akita/+}*, ils ont aussi démontré qu'une expression plus élevée de la MGP menait à une diminution de l'activité BMP, une diminution de l'expression de Runx2, d'ostérix et de l'OPN, et finalement une normalisation du contenu calcique aortique. Par contre, la γ -carboxylation de la MGP n'a pas été évaluée dans cette étude.

1.4.4. Altération de la γ -carboxylation dans le diabète

Certains indices laissent croire que le processus de γ -carboxylation est altéré en présence de diabète. Ces indices sont le résultat d'études sur la γ -carboxylation de l'OC. Chez des hommes souffrant de T2DM, les concentrations plasmatiques de *ucOC* et le ratio des concentrations *ucOC/OC* est inversement proportionnel aux concentrations de glucose sanguin³⁶⁶. Chez des femmes diabétiques souffrant d'ostéoporose, la γ -carboxylation de l'OC est diminuée significativement par rapport à celles ne souffrant pas d'ostéoporose et ce, pour des concentrations plasmatiques de vitamine K similaires³⁶⁷. Cette constatation laisse suggérer que malgré un apport de vitamine K semblable, la γ -carboxylation de l'OC est tout de même altérée. Une hypothèse possible avancée par les auteurs de l'étude est que l'activité de la γ -

carboxylase pourrait être diminuée et ainsi mener à l'augmentation des concentrations de *ucOC*³⁶⁷.

1.4.5. Altération du métabolisme des lipides dans le diabète

Après l'absorption intestinale, la vitamine K, en tant que vitamine liposoluble, est incorporée dans les chylomicrons pour son transport vers le foie (Figure 35). Les chylomicrons sont des lipoprotéines responsables du transport des triglycérides. Sous l'action de la lipoprotéine lipase, une enzyme associée à l'endothélium capillaire, les chylomicrons sont dégradés en acide gras libres et en glycérol dans la circulation sanguine. Les chylomicrons deviennent alors des chylomicrons remnants (CR). Ainsi, une fois dans la circulation, la vitamine K est métabolisée au même taux que les chylomicrons. Les CR et les *very low density lipoprotein* (VLDL) constituent les lipoprotéines riches en triglycérides (TRL), principales responsables du transport de la vitamine K dans la circulation³⁶⁸; environ 50 à 70% de la vitamine K est associée aux TRL suite à son ingestion, le reste étant associé au *high density lipoprotein* (HDL) et au LDL. D'ailleurs, il a été démontré que les concentrations de vitamine K corrélaient positivement avec les concentrations de TRL³⁶⁹. Par l'intermédiaire des apolipoprotéines (Apo) E et B-48, les CR se lient aux récepteurs *lipoprotein receptor-related lipoprotein* (LRP) et *low density lipoprotein receptor* (LDLR) à la surface des hépatocytes, pour ensuite être absorbés par endocytose. Les protéoglycanes héparane sulfate (HSPG) sont aussi impliqués. Les lipides retournant à la circulation sanguine sont alors maintenant sous la forme de VLDL, contenant les ApoE, ApoC et ApoB-100. Le mécanisme d'absorption de la vitamine K par les os est peu connu, et il l'est encore moins pour les CMLV. Pour les os, les mécanismes proposés impliquent les récepteurs LRP1 et LDLR³⁷⁰, ainsi que les HSPG³⁷¹. En effet, après la suppression des HSPG par une méthode enzymatique, le captage de la vitamine K au niveau osseux est réduit³⁷¹.

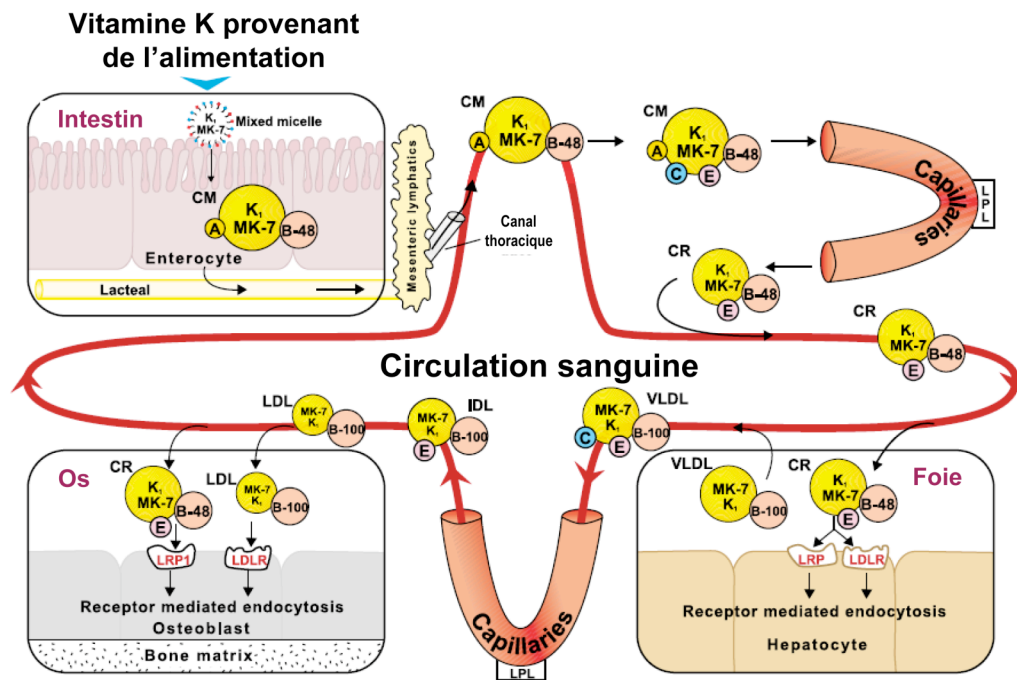


Figure 35: Métabolisme de la vitamine K.

Adapté de ²⁶⁶.

Plusieurs études démontrent que le métabolisme des CR est altéré en présence de T1DM^{372,373}, notamment pour ce qui est de la capture hépatique des lipoprotéines. Le T1DM amène une dysrégulation de la HSPG *syndecan-1* au niveau hépatique, due à un défaut dans son assemblage, ce qui conduit à une clairance retardée des CR et à leur accumulation dans le plasma^{374,375}. Les rats STZ ont une diminution³⁷⁴ de la clairance des lipoprotéines du plasma, qui se traduit par une augmentation de la concentration des triglycérides plasmatiques³⁷⁶. Chez les personnes possédant le génotype ApoE E2/2, les CR subsistent dans la circulation pour des périodes prolongées en raison d'une clairance diminuée. Chez ces mêmes personnes, la γ -carboxylation de l'OC est diminuée, malgré une concentration plasmatique élevée de vitamine K, indiquant qu'un désordre dans le transport de la vitamine K pourrait conduire à un trouble de la γ -carboxylation³⁶⁸. De même, chez les souris ApoE -/-, une diminution de la capture des TRL par les ostéoblastes est observée, altérant ainsi le métabolisme de la vitamine K. Il n'est

alors pas surprenant de constater que chez ces souris, la majorité de l'OC présente est incapable de lier l'hydroxyapatite, c'est-à-dire qu'elle est sous sa forme non-carboxylée³⁷⁷. Cet exemple démontre une fois de plus le lien potentiel entre le métabolisme des lipides, la vitamine K et la γ -carboxylation des protéines VKD.

1.4.6. Cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de la calcification vasculaire associée au diabète

Diverses options de traitement ont été abordés précédemment. Dans cette section-ci, le potentiel thérapeutiques de quelques molécules affectant certains facteurs suggérés comme étant impliqués dans l'accélération de la calcification vasculaire associée au diabète, comme la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et AGE/RAGE, est abordé. Même si l'emphase de cette thèse est mise sur la calcification artérielle médiale associée au T1DM, il n'est toutefois pas toujours possible de catégoriser l'un ou l'autre des traitements comme étant spécifique à un type de diabète en particulier, ceux qui seraient utiles pour la calcification intinale pouvant aussi être bénéfiques pour la calcification médiale.

1.4.6.1. Dkk1

La *Dickkopf related protein-1* (Dkk1) est un inhibiteur soluble de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine³⁷⁸, de par son interaction avec LRP5/6. *In vivo*, Msx2 entraîne une diminution de l'expression de Dkk1¹⁵⁷. *In vitro*, l'ajout de Dkk1 recombiné au milieu de culture renverse l'action ostéogénique de Msx2¹⁵⁷. Le traitement de myofibroblastes aortiques avec Dkk1 inhibe aussi l'induction de l'ALP, un signal ostéogénique provoqué par l'activation de la voie Msx2-Wnt³⁷⁹. Par contre, l'action inhibitrice de Dkk1 n'a pas été évaluée dans le contexte de la calcification vasculaire chez les humains, mais des études ont été menées pour évaluer la possibilité d'utiliser les concentrations plasmatiques de Dkk1 comme biomarqueur de la calcification vasculaire. Il existe en effet une relation inverse entre les concentrations plasmatiques de Dkk1 et la calcification des plaques athérosclérotiques^{380,381}. Le mécanisme

d'action de la thalidomide, ce médicament bien connu pour ses effets tératogènes, passe justement par la modulation de la voie BMP/Dkk1/Wnt³⁸², mais il ne semble pas que son effet sur la calcification vasculaire n'ait été évalué. Un composé qui pourrait éventuellement être étudié dans le contexte qui nous intéresse est le BHQ880, un anticorps monoclonal dirigé contre Dkk1 présentement en essai clinique de phase II afin d'évaluer son potentiel pour le traitement des lésions ostéolytiques chez les personnes souffrant de myélome multiple³⁴⁶.

1.4.6.2. AGEs

Tel que mentionné précédemment, il est suggéré que les AGEs induisent la calcification des CMLV suite à l'interaction avec RAGE^{360,361}. RAGE pourrait alors constituer une cible pharmacologique potentielle pour le traitement de la calcification vasculaire. Grâce aux travaux réalisés dans le laboratoire dirigé par la Dr. Ann Marie Schmidt, très connue pour ses recherches sur les AGEs, une molécule agissant comme antagoniste de RAGE a été mise au point. Cette molécule, appelé le PF-04494700, bloque la liaison des ligands endogènes à RAGE et a l'avantage d'être biodisponible oralement. Elle est présentement en développement clinique de phase II, pour le traitement des néphropathies diabétiques et pour l'Alzheimer. Il pourrait être intéressant d'évaluer les bénéfices qui pourraient être accordés par le PF-04494700 en ce qui a trait à la calcification vasculaire associée au diabète.

La forme soluble du récepteur, sRAGE, est une forme tronquée qui agit comme un leurre pour RAGE. sRAGE empêche donc la liaison des AGEs à leur récepteur, prévenant ainsi l'activation subséquente des cascades de signalisation induite par l'interaction AGE/RAGE. Par exemple, l'administration de sRAGE recombinant dans des modèles murins de diabète de type 2 a permis de stabiliser la progression de l'athérosclérose et de diminuer la taille des plaques athérosclérotiques³⁸³. Existe-t-il des molécules qui modulent les concentrations de sRAGE chez l'humain? Certains essais cliniques ont effectivement été menés afin d'évaluer cette possibilité. Il a été démontré que l'atorvastatine³⁸⁴, la rosiglitazone³⁸⁵ et le perindopril³⁸⁶ augmentaient les niveaux de sRAGE. La simvastatine, quant à elle, inhiberait de façon marquée l'expression de RAGE dans les plaques athérosclérotiques humaines³⁸⁷. Une fois de plus, il pourrait être intéressant d'étudier la

modulation de sRAGE par ces molécules chez des patients atteints de T1DM et d'en évaluer l'impact sur la calcification artérielle médiale dans le contexte du diabète.

1.5. Modèles animaux de calcification artérielle médiale associée au diabète

1.5.1.1. Vitamine D/Streptozotocine

Un modèle animal combinant l'administration de vitamine D et de STZ chez le rat a été décrit dans la littérature³⁸⁸. Le développement de ce modèle d'artériosclérose en présence de T1DM avait comme objectif principal d'étudier l'effet de l'administration de la vitamine K2 et de l'estradiol sur le contenu en calcium de l'aorte. Malheureusement, l'étude ne présente pas les résultats du contenu calcique de l'aorte pour l'administration de vitamine D seule, ni pour l'administration de STZ seule, mais uniquement pour la combinaison. Il est donc impossible d'évaluer l'impact du diabète sur la calcification induite par la vitamine D.

Une des difficultés avec ce type de modèle est le risque de mortalité élevé auquel sont exposés les animaux. D'une part l'induction du T1DM par l'injection de STZ provoque un certain degré d'anorexie et de déshydratation chez les animaux. D'autre part, l'administration de fortes doses de vitamine D, nécessaires pour induire la calcification, provoque également une anorexie. Ces insultes majeures exigent un *monitoring* serré des animaux.

1.5.1.2. Modèle d'accélération de la calcification artérielle médiale associée au diabète

Un modèle de complications macrovasculaires a été développé récemment dans notre laboratoire³⁸⁹. Ce modèle jumelle l'administration de warfarine et de vitamine K à celle de la STZ. La dose de STZ est toutefois plus faible que celle habituellement utilisée pour induire le T1DM. Les rats sont également nourris avec une diète riche en lipides afin d'induire une résistance à l'insuline. L'hyperinsulinémie est observée initialement, pour ensuite progresser

vers une hypoinsulinémie, démontrant une transition d'un T2DM vers un T1DM. Ce modèle est caractérisé par une calcification artérielle médiale de l'aorte et des artères fémorales, ainsi que par l'augmentation de l'expression de l'OPN et de l'ALP. Un des aspects intéressants de ce modèle est qu'il démontre l'accélération de la calcification artérielle médiale associée au diabète. De plus, l'ampleur de la calcification est directement reliée à la durée du diabète, ce qui représente une similitude avec la pathologie humaine³³⁶. Malheureusement, la warfarine étant utilisée pour inhiber le recyclage de la vitamine K et donc la γ -carboxylation de la MGP pour d'induire la calcification, il n'est pas possible d'utiliser ce modèle pour évaluer la contribution de la MGP au développement de la calcification artérielle médiale associée au diabète.

CHAPITRE 2. Objectifs

2.1. Problématique

L'introduction de cette thèse a permis de mettre en évidence l'importance de la structure des gros troncs artériels pour assurer leur double rôle d'amortissement du flux pulsé de sang et d'irrigation de tous les organes du corps. Par la suite, les conséquences du vieillissement vasculaire sur la structure et les propriétés des gros troncs artériels ont été exposées. Ainsi, la modification des propriétés élastiques des gros vaisseaux, notamment en raison du développement de la calcification vasculaire, amène une augmentation de la rigidité vasculaire. Le message à retenir est sans contredit que la rigidité artérielle est un phénomène qui amène des conséquences cliniques importantes, comme le développement de l'HSI et les dommages aux organes cibles, et est ainsi un important facteur de risque cardiovasculaire. L'emphase a par la suite été mise sur la contribution possible du déséquilibre entre les facteurs pro-calcifiants et les facteurs anti-calcifiant, dont la MGP fait partie, au développement de la calcification artérielle médiale et par conséquent à l'augmentation de la rigidité vasculaire.

La problématique se définit plus spécifiquement au fil du chapitre abordant la thématique de l'accélération de la rigidité vasculaire associée au diabète. En sachant que le développement de la rigidité artérielle est en effet accéléré de 15 ans chez les patients diabétiques, et qu'une calcification précoce des vaisseaux est observée au sein de cette population, il est évident que cette situation soulève des questionnements quant aux mécanismes impliqués dans cette accélération.

Donc, étant donné que:

1. l'augmentation de la rigidité artérielle serait en partie responsable de l'augmentation du risque cardiovasculaire chez les patients diabétiques;
2. la calcification artérielle médiale est une composante pathologique fréquemment observée chez les patients diabétiques et contribue à l'augmentation de la rigidité vasculaire;

3. les mécanismes impliqués dans la calcification précoce des vaisseaux diabétiques sont peu connus;
4. il n'existe pas d'approche pharmacologique considérée comme efficace pour le traitement de la calcification vasculaire...

...nous avons ainsi décidé de concentrer nos efforts de recherche sur les facteurs impliqués dans l'accélération de la calcification vasculaire associée au diabète.

2.2. Objectifs spécifiques

L'hypothèse du déséquilibre entre les facteurs pro-calcifiants et anti-calcifiants énoncée par divers groupes de recherche pour tenter d'expliquer le développement de la calcification vasculaire nous semblant très probable, nous avons décidé d'étudier la protéine anti-calcifiante MGP, afin de préciser son implication possible dans l'accélération de la calcification vasculaire associée au diabète. Plus spécifiquement, nous voulions étudier les enzymes responsables de l'activation de la MGP, c'est-à-dire les enzymes impliquées dans la γ -carboxylation de la MGP, soit la γ -carboxylase et la VKOR. Ainsi, l'objectif principal de cette thèse était de déterminer si ces deux enzymes sont modulées par la présence de diabète d'une part, et d'autre part, de vérifier si cette modulation joue un rôle dans l'accélération de la calcification artérielle médiale en altérant la γ -carboxylation de la MGP.

En premier lieu, l'objectif était de vérifier l'hypothèse voulant qu'une altération de la γ -carboxylation de la MGP était présente au niveau vasculaire dans le modèle animal choisi. Le choix et le développement du modèle consistaient en un objectif en soit, puisqu'aucun des modèles de calcification artérielle médiale associée au diabète défini jusqu'à maintenant ne convenait pour étudier les protéines d'intérêt. Il a donc fallu développer et caractériser notre propre modèle afin de répondre aux besoins de notre étude.

En deuxième lieu, nous voulions vérifier si l'expression et/ou l'activité de la VKOR et la γ -carboxylase étaient modulées dans les artères diabétiques.

En troisième lieu, selon les altérations identifiées, nous voulions finalement déterminer quelles étaient les voies de signalisation impliquées.

CHAPITRE 3. Méthodes

Tous les résultats des expérimentations effectuées dans le but de répondre aux objectifs de cette thèse ne sont pas contenus dans l'article scientifique présenté à la section des résultats. Par conséquent, la section qui suit inclut les méthodes utilisées pour répondre à certains de ces objectifs, dont les résultats sont présentés à la Section 4.2, ainsi que des méthodes requérant davantage de précisions.

3.1. Développement du modèle de calcification artérielle médiale en présence de diabète

Pour ce qui est du modèle animal, notre objectif était de pouvoir étudier nos hypothèses chez le rat, dans un modèle présentant une augmentation de la VOP et une augmentation du contenu calcique au niveau de l'aorte. Le critère de la VOP a été choisi puisque c'est la méthode de référence pour mesurer la rigidité artérielle, tel qu'énoncé précédemment. Initialement, un modèle combinant l'administration de vitamine D, afin d'induire la calcification artérielle médiale, et la STZ, afin d'induire le T1DM, chez le rat Wistar nous a semblé comme ayant un certain potentiel pour répondre à nos exigences. De plus, il ne nécessitait pas l'administration de warfarine, cette dernière modulant directement la γ -carboxylation de la MGP et donc étant à éviter à tout prix. Toutefois, la caractérisation de ce modèle était indispensable avant de pouvoir l'utiliser pour nos études.

Tout d'abord, différentes doses de vitamine D ont été choisies pour être administrées aux animaux, âgés de 5 semaines au début de l'expérimentation. La vitamine D était administrée par gavage aux animaux, une fois par jour selon l'horaire décrit dans le tableau ci-bas (Tableau IV). La vitamine D étant liposoluble, elle devait être dissoute dans l'huile afin d'obtenir une solution homogène et d'administrer la dose prévue. Les animaux contrôles ne recevaient que le même volume d'huile, mais sans vitamine D. L'objectif de cette première étude était de cibler la dose minimale résultant en l'induction de la calcification, et ce, sans qu'il y ait d'impact majeur sur l'alimentation et l'hydratation des animaux de sorte que le taux de survie reste le plus près possible de 100%. Ces critères d'alimentation et d'hydratation, évalués selon la prise de poids des animaux, étaient considérés comme importants puisque l'ajout éventuel d'une dose de STZ chez ces animaux allait possiblement avoir un impact

additif sur ces critères. Les doses de vitamine D, administrées par gavage durant les 2 premiers jours, ont varié entre 50 000 UI et 300 000 UI. Ces doses étaient basées sur ce qui est retrouvé dans la littérature pour ce type de modèle. Les rats étaient pesés trois fois par semaine afin de s'assurer que leur prise de poids était constante. Certains animaux ayant reçu la dose de 300 000 UI n'ont tout de même pas survécu à ce traitement. Lors du sacrifice, les paramètres hémodynamiques ont été enregistrés, et l'aorte, les fémorales ainsi que les carotides ont été prélevées pour en mesurer le contenu calcique.

Groupe	Interventions		Sacrifice		n
	Jour 1	Jour 2	Jour 28	jour 56	
Témoin			→	→	2 X 5
Vitamine D2 50 000 UI/kg	gavage vitamine D	gavage vitamine D		→	2 X 5
Vitamine D2 100 000 UI/kg	gavage vitamine D	gavage vitamine D	→	→	2 X 5
Vitamine D2 200 000 UI/kg	gavage vitamine D	gavage vitamine D		→	2 X 5
Vitamine D2 300 000 UI/kg	gavage vitamine D	gavage vitamine D	→	→	2 X 5

Tableau IV: Description des doses, des interventions, de la durée du traitement ainsi que du nombre d'animaux utilisé pour l'étude pilote sur la vitamine D.

Suite aux résultats obtenus lors de cette première étude pilote, la dose de 150 000 UI de vitamine D a été choisie pour mener la seconde étude pilote, et ainsi être administrée en combinaison avec la STZ, elle-même administrée de façon *i.p.* à la dose de 60 mg/kg. La description des interventions est présentée au Tableau V.

Groupe	Interventions		Sacrifice		n
	Jour 1	Jour 2	Jour 28	jour 56	
Témoin			→	→	2 X 5
STZ	injection <i>ip</i> STZ 60 mg/kg		→	→	2 X 5
Vitamine D2	gavage vitamine D	gavage vitamine D	→	→	2 X 5
STZ + D2	gavage vitamine D injection <i>ip</i> STZ 60 mg/kg	gavage vitamine D	→	→	2 X 5

Tableau V: Description des interventions, de la durée du traitement ainsi que du nombre d'animaux utilisé pour l'étude pilote sur la vitamine D combinée à la présence de T1DM induit par la STZ.

3.2. Activité de la γ -carboxylase

Tel que mentionné dans les limitations de l'article présenté dans cette thèse, la quantité de microsomes aortiques obtenue étant trop faible pour permettre la mesure de l'activité des deux enzymes impliquées dans la γ -carboxylation de la MGP, soit la γ -carboxylase et la VKOR, le choix a dû être fait de ne mesurer que celle de la VKOR. Par contre, comme l'activité de la γ -carboxylase a été mesurée à maintes reprises lors de la mise au point de la méthode et comme cette mesure devait permettre de répondre à une partie de l'objectif principal de cette thèse, il a semblé pertinent de décrire cette méthode dans cette section.

Le principe de la méthode repose sur la mesure de l'incorporation du $^{14}\text{CO}_2$ dans un peptide synthétique suite à la γ -carboxylation de ce peptide. Ainsi, en mesurant l'activité de l'échantillon radioactif, il est possible d'évaluer le degré de γ -carboxylation du peptide. Le peptide utilisé est le FLEEL (phe-leu-glu-glu-leu). Le tampon de resuspension est constitué de

250 mM de phosphate de sodium et 0.5 M de KCl, 20% (w/v) de CHAPS, à un pH=7.85. Les microsomes sont mis en solution dans ce tampon de resuspension pour obtenir une concentration uniforme de microsomes correspondant à 150 µg de protéines. Ce 150 µg est une quantité très faible de protéines: en comparaison, 1 mg de protéines microsomales hépatiques est utilisé pour réaliser cet essai. La solution réactionnelle contient quant à elle 10 mM de MnCl₂, pour permettre la reconstitution des complexes lipidiques membranaires, 5 mM de DTT, un agent permettant la réduction des ponts disulfides, et 10 mM de FLEEL, le peptide à être γ-carboxylé. Après l'ajout de la solution réactionnelle, le NaH¹⁴CO₃ à une concentration finale de 40 µCi/mL et la vitamine K sont ajoutés. La vitamine K utilisée est la vitamine K sous sa forme réduite, soit la vitamine KH₂, pour une concentration finale de 100 µg/mL. Si la vitamine K non-réduite était utilisée, la VKOR contenue dans les échantillons devrait procéder à la réduction de la vitamine K et ceci ajouterait une variable supplémentaire à l'essai puisque la VKOR pourrait ne pas être fonctionnelle de façon égale dans tous des échantillons. Une fois tous les réactifs ajoutés, l'incubation se fait durant la période de temps choisie, allant habituellement de 30 minutes à 2 heures, à 25°C. Par la suite, il faut arrêter la réaction en ajoutant du TCA 10% (w/v) très froid, placer sur glace et laisser les protéines précipiter, ce qui prend environ 30 minutes. Finalement, les échantillons sont centrifugés à 3 000 g durant 30 minutes et le surnageant, qui contient le peptide γ-carboxylé, est prélevé. Il faut ensuite dégazer les échantillons, c'est-à-dire laisser s'échapper le CO₂ qui n'a pas été incorporé dans le peptide par γ-carboxylation. La toute dernière étape est la mesure de la radioactivité des échantillons.

3.3. Marquage Von Kossa

Le marquage Von Kossa permet de détecter la présence de cristaux d'hydroxyapatite sur des coupes histologiques, grâce à une réaction qui transforme les sels de calcium en sels d'argent. Ainsi, cette coloration marque de brun foncé les phosphates et carbonates de calcium présents dans les tissus. Pour réaliser ce marquage, une section de l'aorte thoracique a été incluse dans la paraffine, puis des coupes 5 µm d'épaisseur ont été obtenues au microtome.

Après déparaffinisation et réhydratation, les coupes ont été placées dans une solution de nitrate d'argent 5% (w/v) durant 30 minutes, rincées à l'eau distillée, incubées dans une solution de thiosulfate de sodium et finalement exposées à une source de lumière UV. Les coupes ont ensuite été contre-marquées à l'hématoxyline pour colorer les noyaux, puis déshydratées. Les photomicrographies ont été prises à l'aide d'un microscope, à un grossissement de 400X.

3.4. MGP plasmatique

La quantification de la MGP plasmatique a été réalisée grâce à un essai colorimétrique basé sur une réaction immunoenzymologique, selon les instructions du fabricant (Biomedica Gruppe, Autriche). Le sang a été prélevé chez les rats anesthésiés, à partir d'un cathéter inséré dans l'artère fémorale. Le sang a été récolté dans des tubes contenant de l'EDTA. Le plasma a été extrait par une centrifugation à 1500 g durant 10 minutes, et a été utilisé pour l'essai MGP.

3.5. Détermination des voies signalétiques impliquées

Nous avons cherché à développer un modèle *ex vivo* afin de vérifier si l'altération de la γ -carboxylase observée *in vivo* était reproduite dans un milieu hyperglycémique (HG). Ce modèle est décrit dans l'article présenté au Chapitre 4. Comme l'altération a en effet été reproduite, ce modèle nous a entre autres permis d'étudier l'impact de la supplémentation en vitamine K dans ce milieu de culture (Section 4.1). D'autre part, ce modèle nous a aussi donné l'opportunité d'étudier les voies de signalisation impliquées dans la diminution de l'expression de la γ -carboxylase en milieu HG. Ainsi, différents inhibiteurs de voies de signalisation ont été ajoutés aux milieux normo- et hyperglycémique (Tableau VI). Les inhibiteurs suivants ainsi que leur concentrations ont été utilisés:

Inhibiteur	Voie de signalisation ciblée	Concentration utilisée
Wortmannin	PI3K	1 μ M
LY294002	PI3K	10 nM
LY333531	PKC β	200 nM
PD98059	ERK	10 μ M
SP600125	JNK	10 μ M
PD169316	p38	5 μ M

Tableau VI: Inhibiteurs de voies de signalisation et leur concentration de travail.

En ajoutant l'inhibiteur autant à la concentration normoglycémique (NG) qu'à la concentration HG, les échantillons NG devenaient ainsi le contrôle spécifique des échantillons HG correspondants, prenant ainsi en considération l'effet possible du milieu de dissolution, c'est-à-dire le DMSO, ou même encore l'effet possible de l'inhibiteur en condition NG. Ainsi, chacune des conditions HG est exprimée en pourcentage par rapport à la moyenne de son contrôle respectif NG. C'est pour cette raison que sur les Figures 42 et 43, un résultat est présenté pour chacune des concentrations NG en présence de l'inhibiteur donné.

L'incubation des échantillons s'est faite sur une période de 24 heures, puis les anneaux ont été récoltés, les protéines ont été extraites et finalement l'expression de la γ -carboxylase a été évaluée par *western blot*.

L'analyse statistique a évalué, à l'aide du test *t* de Student, si une différence significative existait entre l'expression de la γ -carboxylase en condition HG et son expression en condition NG. Une seconde analyse statistique a évalué, à l'aide d'une ANOVA suivie d'un *post-test* de Dunnett, si l'addition de l'inhibiteur en condition HG prévenait la diminution de l'expression de la γ -carboxylase en condition HG, donc en comparant les conditions HG \pm inhibiteur à la condition HG.

Une expérience pilote a initialement été menée, utilisant chacun des six inhibiteurs. Trois voies de signalisation ont alors été identifiées comme ayant un rôle potentiel dans l'altération de la γ -carboxylase. Par la suite, une seconde expérience a été réalisée, utilisant cette fois-ci ces trois inhibiteurs en particulier, afin de confirmer le résultat initial. Les mêmes analyses statistiques mentionnées ci-haut ont été utilisées pour la seconde expérience également.

CHAPITRE 4. Résultats

4.1. Decreased expression of γ -carboxylase in diabetes-associated arterial stiffness: impact on matrix Gla protein

Cardiovascular Research 2013. 97(2):331-338. Oxford University Press

Marielle Doyon¹, Patrick Mathieu², Pierre Moreau¹

¹Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Canada.

²Department of Cardiac Surgery, Laboratoire d'études moléculaires des valvulopathies, Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec Research Center, Université Laval, Québec, Canada.

Short title: γ -carboxylase and matrix Gla protein in diabetes

4.1.1. Abrégé

Objectifs Le développement de la rigidité vasculaire est accéléré de 15 ans chez les patients diabétiques. La calcification artérielle médiale contribue à l'augmentation de la rigidité vasculaire. La vitamine K époxyde réductase (VKOR) est l'enzyme responsable de la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K hydroquinone, nécessaire à l'enzyme γ -carboxylase pour activer la protéine Gla de la matrice (MGP). Le rôle de la MGP est d'inhiber la calcification vasculaire. L'objectif de cette étude était de vérifier l'hypothèse voulant qu'en présence de diabète, la γ -carboxylation de la MGP dans la paroi aortique est réduite, menant ainsi à une augmentation de la calcification vasculaire, et d'évaluer le rôle de la γ -carboxylase et de la VKOR dans le déficit de γ -carboxylation.

Méthodes et Résultats Le diabète de type 1 a été induit chez le rat Wistar par une injection *i.p.* de streptozotocine. Dans ce modèle, l'augmentation de la rigidité artérielle a été mise en évidence par une augmentation de 44% de la vitesse de l'onde de pouls. Le contenu calcique de l'aorte et de l'artère fémorale était augmenté de 26% et 56% respectivement. La γ -carboxylation de la MGP (cMGP, active) était réduite de 36% alors que l'expression aortique de la γ -carboxylase était diminuée de 58%. L'expression de la γ -carboxylase était corrélée avec la quantité de cMGP ($r = 0.59$) et la calcification aortique ($r = -0.57$). L'expression et l'activité de la VKOR n'ont pas été modifiées par la présence de diabète. Les concentrations plasmatiques de vitamine K étaient augmentées de 191% chez les rats diabétiques. Dans un modèle *ex vivo* d'hyperglycémie utilisant des sections d'aortes, la supplémentation en vitamine K a prévenu la diminution de l'expression de la γ -carboxylase.

Conclusion Nos résultats suggèrent que la réduction de la quantité de cMGP dans la paroi aortique, probablement due à la réduction de l'expression de la γ -carboxylase, pourrait être impliquée dans le développement précoce de la calcification artérielle médiale associée au diabète et par le fait même, dans l'accélération de la rigidité artérielle. Une altération dans la capture de la vitamine K par les cellules cibles pourrait aussi être impliquée.

4.1.2. Abstract

Aims Arterial stiffness is accelerated in type 1 diabetic patients. Medial artery calcification (MAC) contributes to the development of arterial stiffness. Vitamin K oxidoreductase (VKOR) reduces the vitamin K required by γ -carboxylase to activate matrix γ -carboxyglutamic acid (Gla) protein (MGP), an inhibitor of vascular calcification. This study aimed to evaluate the hypothesis that diabetes reduces the γ -carboxylation of MGP in the aortic wall, leading to increased vascular calcification, and the role of γ -carboxylase and VKOR in this γ -carboxylation deficit.

Methods and Results Type 1 diabetes was induced in male Wistar rats with a single *i.p.* injection of streptozotocin. Augmentation of arterial stiffness in diabetic rats was shown by a 44% increase in aortic pulse wave velocity (PWV). Aortic and femoral calcification were increased by 26% and 56% respectively. γ -Carboxylated MGP (*c*MGP, active) was reduced by 36% and aortic expression of γ -carboxylase was reduced by 58%. Expression of γ -carboxylase correlated with *c*MGP ($r = 0.59$) and aortic calcification ($r = - 0.57$). VKOR aortic expression and activity were not modified by diabetes. Vitamin K plasmatic concentrations were increased by 191% in diabetic rats. In *ex vivo* experiments with aortic rings, vitamin K supplementation prevented the glucose-induced decrease in γ -carboxylase expression.

Conclusion Our results suggest that reduced *c*MGP, through an impaired expression of γ -carboxylase, is involved in the early development of MAC in diabetes, and therefore, in the acceleration of arterial stiffness. A defect in vitamin K uptake by target cells could also be involved.

4.1.3. Introduction

Elastic properties of conduit arteries assure their primary function of dampening the pulsatile blood flow generated by the heart.¹ However, aging causes degenerative changes in the mechanical properties of the vessel wall of large arteries, leading to their stiffening. Stiffer arteries have a reduced compliance, resulting in a faster pressure wave propagation along the arterial tree and therefore, early wave reflection.² Arterial stiffness is responsible for isolated systolic hypertension³ and is associated with left ventricular hypertrophy⁴, coronary heart disease⁵ and chronic kidney disease.⁶ Arterial stiffness has also been identified as an independent predictor of cardiovascular risk in the normo- and hypertensive population^{7,8} and consequently, has become an important therapeutic target.⁹

Accelerated arterial stiffness in type 1 diabetes mellitus (T1DM) is supported by a large body of evidence.¹⁰⁻¹³ In fact, arterial stiffness occurs an average of 15 years earlier in patients with T1DM compared to non-diabetic subjects, as demonstrated by the premature rise in pulse pressure (PP) seen in this population.¹⁴ Thus, it is suggested that at least part of the increased cardiovascular risk associated with diabetes may be due to arterial stiffness.^{15,16} Medial artery calcification (MAC), characterized by the deposition of hydroxyapatite crystals along the elastic lamellae of large arteries and subsequent fragmentation of the elastic network, contributes to arterial stiffness.¹⁷ MAC is highly prevalent among T1DM patients and is *per se* a risk marker for cardiovascular events in this population.¹⁸

Matrix Gla protein (MGP) is a vitamin K-dependent protein (VKD), whose role as an inhibitor of vascular calcification has been highlighted by the extensive MAC observed in MGP knock-out mice¹⁹ and in warfarin-treated rats.²⁰ Total MGP mRNA was reported to be lower in peripheral arteries of diabetic patients with MAC²¹, implicating MGP in the regulated process of MAC. MGP is *post*-translationally modified by γ -carboxylase, an integral protein of the endoplasmic réticulum that uses the energy of vitamin K hydroquinone oxygenation to convert glutamic acid residues (Glu) into Ca²⁺-binding γ -carboxyglutamic acid (Gla) to activate MGP and other VKD proteins.²² The vitamin K oxidoreductase (VKOR) then reduces

the vitamin K epoxide product back to vitamin K hydroquinone to complete the cycle.²³ Hence, γ -carboxylase together with VKOR are expected to play crucial roles in allowing proper MGP function. Immunofluorescence staining showed that MGP colocalized with calcification areas in its undercarboxylated form (*ucMGP*, inactive) and it was suggested that this accumulation of *ucMGP* could be related to impaired γ -carboxylation and to the loss of protection against calcification.²⁴ However, the presence of *ucMGP* has only been evaluated locally at sites of overt calcification, and the mechanisms involved in γ -carboxylation impairment of MGP have not been investigated yet.

The aim of this study was to test the hypothesis that diabetes reduces γ -carboxylated MGP (*cMGP*, active) in the vessel wall early in the disease, contributing to the development of MAC and consequently, the acceleration of arterial stiffness. We hypothesized that the γ -carboxylation deficit was attributable to a defective γ -carboxylase and/or an inadequate recycling of vitamin K by VKOR. A rat model of diabetes-associated arterial stiffness was used to investigate the modulation of γ -carboxylase and VKOR in the context of diabetes and the impact of this modulation on the γ -carboxylation of MGP.

4.1.4. Methods

4.1.4.1. Animal procedures

A total of 60 male Wistar rats aged 5 weeks (Charles River Laboratories, Qc, Canada) were used in this study. Animals were housed for one week before the beginning of the study, and had free access to water and chow. After an overnight fast, rats ($n=30$) were administered a single *i.p.* injection of streptozotocin (60 mg/kg) freshly diluted in 0.05 mol/L citrate buffer at pH 4.5. Blood glucose levels were monitored every other day with a glucometer (Accusoft Advantage from Roche, Qc, Canada) and animals with blood glucose levels above 15 mmol/L were considered diabetic. Control rats ($n=30$) consisted of age-matched untreated rats. Rats were sacrificed after 9 weeks. Food was removed 12 hours before sacrifice, and rats were anesthetized with an *i.p.* injection of sodium pentobarbital (65 mg/kg). The depth of anesthesia

was evaluated by the absence of pedal withdrawal reflex. To ensure adequate analgesia, lidocaine 0.5% (7 mg/kg) was injected subcutaneously prior to making the incisions necessary to assess hemodynamic parameters, as well as dripped into the incisions and surrounding tissues. A first catheter (polyethylene-50, Folioplast SA, Sarcelles, France) was inserted into the distal abdominal aorta through the left femoral artery, and a second catheter was inserted into the aortic arch through the left carotid. Catheters were connected to a pressure transducer for measurements of diastolic and systolic blood pressures at each site. Pulse wave velocity (PWV) was evaluated by the foot-to-foot method.²⁵ Arterial blood was drawn from the femoral catheter and collected in a tube containing EDTA. Plasma was extracted by a 10-minute centrifugation at 1500 g. Rats were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital (200 mg/kg) *i.p.* followed by exsanguination. The aorta was then isolated and cleaned of perivascular fat and connective tissue. A 3 mm ring was taken between the third and the fourth intercostal arteries, fixed in 4% cacodylate-buffered paraformaldehyde for 12 hours, processed according to standard histological procedures and paraffin-embedded for further analysis. A section between the second and the third intercostal arteries and a femoral artery were harvested for measurement of calcium content. The remaining aorta was immediately snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for determination of protein expression and enzyme activity. A maximum of aortic tissue was needed to measure enzymatic activities, justifying the use of 30 rats/group. Therefore, a restricted number of aortic rings was then used for the subsequent measurements. These numbers *n* are indicated in their respective methodological section. All experimental procedures were approved by the Université de Montréal ethics committee on animal care. This investigation conforms with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the United States National Institutes of Health (NIH Publication, 8th Edition, 2011).

4.1.4.2. Vascular calcification

Sections of the thoracic aorta and the femoral artery were dried for an hour at 55°C. Calcium was extracted with 10% formic acid (30 μ L/mg) overnight at 4°C. Colorimetric quantification of calcium content was achieved following the reaction of calcium with o-

cresolphthalein in an alkaline medium (Teco Diagnostics, CA, USA). Results are expressed as μg of calcium per mg tissue.

4.1.4.3. Collagen content

5 μm aortic sections were stained with Masson's Trichrome according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, ON, Canada). For quantification, sample images (4 images per aorta, magnification 400X) were imported in Visiopharm Integrator System (3.4.1.0) MicroImagerTM. Using the acquisition module, a *Region Of Interest* (ROI) was defined to outline the media in each image. Quantitative analysis of collagen area using a Bayesian classification method was applied on all the samples. Results are expressed as % of collagen area in aortic media.

4.1.4.4. Immunoblotting

A portion of pulverized aorta was lysed in extraction buffer. Equal amounts of protein (50 μg) were loaded onto either a Glycine- (γ -carboxylase) or a Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (VKOR and cMGP) as described²⁶ and transferred to a BioTraceTM NT (Pall Corporation, FL, USA) nitrocellulose membrane after electrophoresis. Membranes were hybridized with primary antibodies directed against VKOR (Acris Antibodies, CA, USA), γ -carboxylase (Abcam Inc., MA, USA), cMGP (Enzo Life Sciences, NY, USA) or GAPDH (Cell signaling, MA, USA) followed by incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-mouse or anti-rabbit, Cell Signaling). Membranes were incubated with ECL Plus (GE Healthcare Life Sciences, NJ, USA), exposed to film and bands were quantified by densitometry. Results are normalized to GAPDH.

4.1.4.5. Immunofluorescence

Paraffin-embedded aortic segments were cut into 5 μm sections, deparaffinized and incubated with a mouse monoclonal antibody against *ucMGP* (Enzo Life Sciences), then with a goat anti-mouse secondary antibody coupled to Alexa Fluor546 (Invitrogen, OR, USA) and counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen). Substitution of primary antibody with PBS was used as a negative control and aortic sections of rats treated with warfarin were used as a positive control. Aortic sections were visualized with a fluorescence microscope and photomicrographs were captured at 100X and 400X magnification.

4.1.4.6. Aortic microsomes

Aortic samples from 7 to 8 rats were pooled to yield one microsome preparation. Therefore, 4 microsomal preparations per group were obtained. Details of the protocol are provided in the online Supplementary Data. Microsomes were stored at -80°C for less than one week before use.

4.1.4.7. VKOR enzymatic activity

The enzymatic activity of VKOR was assayed in aortic microsomes by measuring the formation of vitamin K from vitamin K epoxide.²⁷ Details of the protocol are provided in the online Supplementary Data. Results are expressed as nmol of vitamin K per mg of microsomal protein.

4.1.4.8. Vitamin K plasmatic concentrations

For vitamin K quantification, samples were prepared as described²⁸, with minor modifications. Details of the protocol are provided in the online Supplementary Data. Results are expressed as ng of vitamin K per mL of plasma.

4.1.4.9. Osteocalcin plasmatic concentrations

Undercarboxylated and γ -carboxylated osteocalcin concentrations were measured with rat competitive enzyme immunoassay kits, both from Takara (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) and according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as ng of OC/mL of plasma.

4.1.4.10. *Ex vivo* experiments

A total of 12 male Wistar rats weighing 375 to 400g were sacrificed as described above. The thoracic aorta was isolated under sterile conditions and cleaned of perivascular fat and connective tissue. Segments (~4-5 mm) were randomized and placed in DMEM (Wisent Inc., Qc, Canada) supplemented with 100 U/mL penicilin, 100 μ g/mL streptomycin and containing either a normal (NG, 5 mM) or a high concentration of glucose (HG, 25 mM). As an additionnal condition, HG was supplemented with vitamin K (HG+Vit.K, 50 μ M). Mannitol (Mn, 20 mM) was used as an osmotic control. Media were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After 24h, segments were washed in PBS and frozen at -80°C for less than one week before use. Graphs show the data from three experiments and results are expressed as a percentage vs. respective NG group.

4.1.4.11. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical comparisons were made between control and diabetic groups using an unpaired *t*-test. For *ex vivo* experiments, data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni *post hoc* analysis. A linear regression analysis was performed to detect the relation between selected variables and Pearson's correlation coefficients *r* were used to quantify this relation. Statistical significance was set at $p < 0.05$. The required sample size to detect a minimum of 25% change in calcium content, imposed as a criterion for the rat model based on previous experiments²⁹,

was determined *a priori* with a power analysis with a $\beta = 0.2$, $\alpha = 0.05$ and $\sigma = 0.2$, for a $n=13/\text{group}$.

4.1.5. Results

4.1.5.1. Animal model of diabetes-associated arterial stiffness

All animals injected with streptozotocin ($n=30$) suffered from hyperglycemia with an average blood sugar level of 21.9 mmol/L (Table) and hence were considered diabetic. The increase in body weight was consistent throughout the nine weeks of the study, although the increase was smaller among diabetic rats, which weighed approximately 30% less than the age-matched controls at time of sacrifice. Diabetic rats had an increased LV mass index (21% increase *vs.* controls; Table). Nine weeks of diabetes induced an augmentation of arterial stiffness, as demonstrated by the increase in PWV (44% increase *vs.* controls; Table), while no change in PP or mean arterial pressure (MAP) was observed. Aortic calcium content was significantly elevated in diabetic rats compared to controls, and to a greater extent in femoral arteries (respectively 26% and 56% increase *vs.* controls; Figure 1A and B). The proportion of collagen in sections of thoracic aorta was higher in diabetic rats (32% increase *vs.* controls; Figure 1C), and was observed mainly around the elastic lamellae of the vessels.

4.1.5.2. γ -carboxylation of MGP

The amount of *c*MGP was significantly reduced in the aortas of diabetic rats compared to the control group (36% reduction *vs.* controls; Figure 2A). Qualitative evaluation of undercarboxylated MGP (*uc*MGP, inactive) showed that it was detectable in aortic sections of diabetic rats, although not as an homogenous deposition. *uc*MGP was predominantly expressed on the elastic lamellae of the vessels (Figure 2B), as well as in the media enclosed in between the stained lamellea. No staining was observed in the aortas of control rats.

4.1.5.3. Aortic expression of γ -carboxylase

Diabetic rats had a marked reduction of γ -carboxylase aortic expression (58% reduction *vs.* controls; Figure 3A). This effect was significantly correlated to the decrease in *cMGP* expression (Figure 3B). In addition, an inverse correlation was found between the expression level of γ -carboxylase and the amount of calcification in the aorta (Figure 3C).

4.1.5.4. Aortic expression and activity of VKOR

The expression of VKOR was unchanged following nine weeks of diabetes (Figure 4A). Moreover, VKOR activity in aortic microsomes was not modified in diabetic rats compared to controls (Figure 4B).

4.1.5.5. Vitamin K plasmatic concentrations

In diabetic rats, plasmatic concentrations of vitamin K were higher than in control rats (191% increase *vs.* controls; Figure 5A).

4.1.5.6. Osteocalcin plasmatic concentrations

Plasmatic concentrations of *ucOC* were similar between control and diabetic rats, whereas the concentrations of γ -carboxylated OC (*cOC*) were significantly reduced in diabetic rats (13% reduction *vs.* controls; Figure 5B) and thus, the ratio of *ucOC/cOC* was increased in diabetic rats (24% increase *vs.* controls; Figure 5C).

4.1.5.7. *Ex vivo* model of hyperglycemia

In aortic segments cultured in high glucose medium for 24h, *cMGP* was reduced by 17% although this change was not significant (Figure 6A). Supplementation with vitamin K did not modify *cMGP* expression. On the other hand, γ -carboxylase expression was

significantly reduced (26% reduction *vs.* controls; Figure 6B), an effect that was prevented by the addition of vitamin K to the culture medium. No significant changes were observed in VKOR expression (Figure 6C).

4.1.6. Discussion

The first challenge of this study was to develop a rat model of accelerated arterial stiffness in the context of TD1M in order to investigate the modulation of proteins of interest. Our diabetic model was successful at meeting the primary endpoints, namely elevated aortic PWV and increased MAC in the aorta and femoral arteries, and therefore was considered an appropriate tool to study our hypothesis.

A correlation between PWV and aortic calcium content has previously been demonstrated in the warfarin-vitamin K (WVK) rat model of MAC.³⁰ Thus, the elevated aortic PWV observed in our model is expected to be a result of the increased calcification detected in the aortic media. However, the amount of calcium was lower than in most models of MAC, suggesting that the model represents an early time-point in the development of diabetes-induced MAC. Indeed, MAC is known to be related to the duration of diabetes.^{18,29,31} Calcification was higher in femoral arteries, in accordance with previous data in diabetic models.²⁹ The increase in aortic collagen in diabetic rats could also have contributed to the elevated PWV, since arterial stiffness depends on the relative contribution of elastin and collagen³², but this change is expected to be independent of the modulation of MGP: in atherosclerotic lesions, MGP is systematically detected at sites of calcification, but not in areas of fibrous tissue.³³ The absence of change in PP was not unexpected because as opposed to PWV depending solely on the stiffness of the vessel, PP varies according to factors other than arterial stiffness; it depends on ventricular ejection, stroke volume, the amplitude of the reflected wave and the site of reflection points.^{5,34,35} These parameters were not evaluated in the present study, it is therefore difficult to interpret this result adequately. Nonetheless, STZ-treated diabetic rats had a slower heart rate, higher LV mass index, hypertrophied cardiomyocytes relative to LV mass (Figure S1, Supplementary material online) and are

reported to suffer from myocardial diastolic dysfunction as early as after 5 weeks of diabetes.³⁶ These cardiac alterations might have thereby influenced PP.

The amount of *cMGP* was decreased in the aorta of diabetic rats. To the best of our knowledge, this is the first time that a lack of *cMGP* in the aorta early in the development of diabetes-induced MAC is demonstrated. This finding supports the hypothesis that the γ -carboxylation of MGP is altered in diabetes, reducing the ability of MGP to inhibit vascular calcification and thereby contributing to the acceleration of arterial stiffness. Whereas previous evidence showed that total MGP mRNA was lower in peripheral arteries of diabetic patients suffering from MAC²¹, the present data provide new insights into the amount of functionally active MGP, *i.e.* capable of binding Ca^{2+} , in the diabetic vessel wall. Also, it was shown that *ucMGP* accumulates at established sites of calcification lesions.²⁴ In our model, calcification lesions were not overtly apparent microscopically. However, *ucMGP* was present on the elastic lamellae of aortic sections of diabetic rats, suggesting that even before calcification can be detected histologically, MGP γ -carboxylation is impaired at potential sites of hydroxyapatite nucleation. Nevertheless, it is important to emphasize the fact that more abundant inactive MGP (*ucMGP*) does not cause calcification, but it is rather the lack of functionally active MGP (*cMGP*) that is expected to contribute to the development of MAC. The specific role of insulin in the regulation of MGP expression is currently unclear, with conflicting results in rat and mouse models of hyperinsulinemia^{37,38} or following direct stimulation of vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rat.³⁹

A major finding of this study is the marked reduction of the expression of γ -carboxylase in the aorta of diabetic rats. We propose that this low expression of γ -carboxylase results in altered γ -carboxylation of MGP, a prerequisite for its activity as an inhibitor of calcification. In turn, this deficit in active MGP leads to a disequilibrium between inhibitors of calcification and osteogenic signals, promoting an extracellular environment prone to pathologic mineralization in diabetes. The fact that the γ -carboxylase protein level was positively correlated to *cMGP* abundance and negatively correlated to aortic calcium content

reinforces this rationale. Impaired γ -carboxylation is observed in other pathologies such as urolithiasis, in which the formation of calcium oxalate calculus has been attributed to a decreased expression of γ -carboxylase in renal cortex specimens and a reduced γ -carboxylation of the VKD protein urinary prothrombin fragment-1 (UPTF1), a potent inhibitor of calcium oxalate crystal growth.⁴⁰ Likewise, the PXE-like syndrome is a disorder characterized by the mineralization of elastic fibers due to a mutation in the GGCX gene coding for γ -carboxylase. This leads to a deficit in γ -carboxylation of VKD proteins such as MGP and osteocalcin (OC), a pro-osteoblastic protein synthesized in bone, as evidenced by a higher ratio of undercarboxylated/ γ -carboxylated (*uc/c*) of both MGP and OC in serum.⁴¹ Similarly, our results show that diabetic rats also had a higher plasmatic ratio of *ucOC/cOC*, adding further evidence to support the hypothesis of a γ -carboxylation disorder in T1DM.

It has been suggested that the accumulation of inactive *ucMGP* in areas of calcification in femoral arteries of diabetic patients could be a consequence of local vitamin K deficiency.²⁴ Given that VKOR is responsible for providing the necessary reduced vitamin K to γ -carboxylase in order to activate MGP, we speculated that decreased aortic *cMGP* and therefore increased MAC in diabetes could be attributable to a defect in VKOR. However, neither VKOR expression nor activity were modified in the aorta of diabetic rats, suggesting that if a vitamin K deficiency in the vasculature is indeed present, it would not be related to VKOR's ability to reduce vitamin K.

An increased *ucOC/cOC* ratio is frequently used as a functional biomarker to indicate a low vitamin K status.⁴² Surprisingly, elevated concentrations of vitamin K plasmatic were found in diabetic rats compared to controls despite a higher ratio of *ucOC/cOC*. This finding strengthens the hypothesis that γ -carboxylase is, at least in part, responsible for the γ -carboxylation deficit *in vivo* in diabetic rats. The elevated circulating levels of vitamin K could be explained by the impairment in lipid metabolism in T1DM⁴³, notably in terms of altered clearance of chylomicron-remnants (CR), thus promoting vitamin K retention in plasma given that CR are the main carriers of vitamin K in the blood.⁴⁴ This situation is observed in

individuals carrying the apolipoprotein E genotype E2/2 in which CR clearance is thought to be the slowest, causing vitamin K to remain in the circulation for a prolonged period of time and to attain higher concentrations.⁴⁵ Furthermore, plasma levels of vitamin K correlates positively with triglycerides concentrations⁴⁶ and STZ-treated rats are indeed reported to suffer from hypertriglyceridemia as a result of a defect in lipoprotein removal from the plasma.⁴⁷ In our study, a high glucose concentration *per se* reduced γ -carboxylase expression in aortic segments cultured *ex vivo*, once again highlighting the role of γ -carboxylase as a potential culprit for MAC in diabetes. In these isolated aortic rings taken from healthy rats, vitamin K supplementation prevented the glucose-induced reduction of γ -carboxylase expression, emphasizing the fact that lipid metabolism alterations as well as other structural and functional changes in the vasculature might alter proper vitamin K uptake by target cells in diabetic animals and possibly result in a local deficiency even when elevated circulating levels of vitamin K are present.

The extremely small amount of microsomes in vascular tissue represented a limitation to this study and required to pool a large number of aortas in order to obtain the necessary material for enzymatic assays. A total of 60 rats allowed for only one assay, and it was chosen to be VKOR to rule out its potential contribution to the reduction of aortic *cMGP*, as the expression of VKOR was not altered. γ -carboxylase activity was therefore not measured, but the marked reduction of its expression was considered to be a strong evidence.

In conclusion, our findings suggest that a reduction in active *cMGP*, through an impaired expression of γ -carboxylase, is involved in the early development of MAC in diabetes and therefore, in the acceleration of arterial stiffness. Moreover, a defect in vitamin K uptake by target cells could also be involved in diabetes-associated MAC. Further studies are underway to elucidate the signalling pathways implicated in γ -carboxylase regulation in diabetes.

4.1.7. Acknowledgements

The authors are thankful for the technical assistance of Louise Ida Grondin. The LC-MS/MS analysis was provided by the Laboratoire de Spectrométrie de Masse at Université de Montréal.

4.1.8. Funding

This work was supported by a Canadian Institutes for Health Research (CIHR) grant [160829]. MD received the Jacques de Champlain scholarship from the FRSQ/Société québécoise d'hypertension artérielle (SQHA). PM is a research scholar from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

4.1.9. References

1. Safar ME, Jankowski P. Central blood pressure and hypertension: role in cardiovascular risk assessment. *Clin Sci (Lond)* 2009; **116**: 273-282.
2. Greenwald SE. Ageing of the conduit arteries. *J Pathol* 2007; **211**: 157-172.
3. O'Rourke MF. Isolated systolic hypertension, pulse pressure, and arterial stiffness as risk factors for cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 1999; **1**: 204-211.
4. Watabe D, Hashimoto J, Hatanaka R, Hanazawa T, Ohba H, Ohkubo T *et al.* Electrocardiographic left ventricular hypertrophy and arterial stiffness: the Ohasama study. *Am J Hypertens* 2006; **19**: 1199-1205.
5. Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, Gautier I, Benetos A, Lacolley P *et al.* Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension* 2002; **39**: 10-15.
6. O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension* 2005; **46**: 200-204.

7. Benetos A, Safar M, Rudnichi A, Smulyan H, Richard JL, Ducimetieere P *et al.* Pulse pressure: a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population. *Hypertension* 1997; **30**: 1410-1415.
8. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L *et al.* Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 2001; **37**: 1236-1241.
9. Cockcroft JR, Wilkinson IB. Large arterial stiffness: an important therapeutic target. *J Hum Hypertens* 2000; **14**: 533-535.
10. Urbina EM, Wadwa RP, Davis C, Snively BM, Dolan LM, Daniels SR *et al.* Prevalence of increased arterial stiffness in children with type 1 diabetes mellitus differs by measurement site and sex: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *J Pediatr* 2010; **156**: 731-737, 737 e731.
11. Berry KL, Skyrme-Jones RA, Cameron JD, O'Brien RC, Meredith IT. Systemic arterial compliance is reduced in young patients with IDDM. *Am J Physiol* 1999; **276**: H1839-1845.
12. Brooks B, Molyneaux L, Yue DK. Augmentation of central arterial pressure in type 1 diabetes. *Diabetes care* 1999; **22**: 1722-1727.
13. Giannattasio C, Failla M, Grappiolo A, Gamba PL, Paleari F, Mancia G. Progression of large artery structural and functional alterations in Type I diabetes. *Diabetologia* 2001; **44**: 203-208.
14. Ronnback M, Fagerudd J, Forsblom C, Pettersson-Fernholm K, Reunanen A, Groop PH. Altered age-related blood pressure pattern in type 1 diabetes. *Circulation* 2004; **110**: 1076-1082.
15. Cameron JD, Cruickshank JK. Glucose, insulin, diabetes and mechanisms of arterial dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; **34**: 677-682.
16. Stehouwer CD, Henry RM, Ferreira I. Arterial stiffness in diabetes and the metabolic syndrome: a pathway to cardiovascular disease. *Diabetologia* 2008; **51**: 527-539.
17. Mackey RH, Venkitachalam L, Sutton-Tyrrell K. Calcifications, arterial stiffness and atherosclerosis. *Adv Cardiol* 2007; **44**: 234-244.

18. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; **16**: 978-983.
19. Luo G, Ducey P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; **386**: 78-81.
20. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 1400-1407.
21. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999; **100**: 2168-2176.
22. Berkner KL. The vitamin K-dependent carboxylase. *J Nutr* 2000; **130**: 1877-1880.
23. Rishavy MA, Usabalieva A, Hallgren KW, Berkner KL. Novel insight into the mechanism of the vitamin K oxidoreductase (VKOR): electron relay through Cys43 and Cys51 reduces VKOR to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation. *J Biol Chem* 2011; **286**: 7267-7278.
24. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A *et al.* Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 1629-1633.
25. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens* 2003; **16**: 103-110.
26. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; **166**: 368-379.
27. Chu PH, Huang TY, Williams J, Stafford DW. Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 19308-19313.

28. Fu X, Peterson JW, Hdeib M, Booth SL, Grusak MA, Lichtenstein AH *et al.* Measurement of deuterium-labeled phylloquinone in plasma by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 2009; **81**: 5421-5425.
29. Bouvet C, Peeters W, Moreau S, DeBlois D, Moreau P. A new rat model of diabetic macrovascular complication. *Cardiovasc Res* 2007; **73**: 504-511.
30. Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res* 2005; **66**: 307-317.
31. Young MJ, Adams JE, Anderson GF, Boulton AJ, Cavanagh PR. Medial arterial calcification in the feet of diabetic patients and matched non-diabetic control subjects. *Diabetologia* 1993; **36**: 615-621.
32. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D *et al.* Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006; **27**: 2588-2605.
33. Canfield AE, Farrington C, Dziobon MD, Boot-Handford RP, Heagerty AM, Kumar SN *et al.* The involvement of matrix glycoproteins in vascular calcification and fibrosis: an immunohistochemical study. *J Pathol* 2002; **196**: 228-234.
34. Laurent S. Surrogate measures of arterial stiffness: do they have additive predictive value or are they only surrogates of a surrogate? *Hypertension* 2006; **47**: 325-326.
35. Safar M. Arteries in Clinical Hypertension. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1994.
36. Gao X, Xu Y, Xu B, Liu Y, Cai J, Liu HM *et al.* Allopurinol attenuates left ventricular dysfunction in rats with early stage of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2012.
37. Zhou YB, Zhang J, Cai Y, Teng X, Duan XH, Song JQ *et al.* Insulin resistance induces medial artery calcification in fructose-fed rats. *Exp Biol Med* 2012; **237**: 50-57.
38. Bostrom KI, Jumabay M, Matveyenko A, Nicholas SB, Yao Y. Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus. *Circ Res* 2011; **108**: 446-457.
39. Wang Y, Zhang B, Bai Y, Zeng C, Wang X. Changes in proteomic features induced by insulin on vascular smooth muscle cells from spontaneous hypertensive rats in vitro. *Cell Biochem Biophys* 2010; **58**: 97-106.

40. Wang T, Yang J, Qiao J, Liu J, Guo X, Ye Z. Activity and expression of vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase in patients with calcium oxalate urolithiasis. *Urol Int* 2010; **85**: 94-99.
41. Vanakker OM, Martin L, Schurgers LJ, Quaglini D, Costrop L, Vermeer C *et al*. Low serum vitamin K in PXE results in defective carboxylation of mineralization inhibitors similar to the GGCX mutations in the PXE-like syndrome. *Lab Invest* 2010; **90**: 895-905.
42. Rennenberg RJ, de Leeuw PW, Kessels AG, Schurgers LJ, Vermeer C, van Engelshoven JM *et al*. Calcium scores and matrix Gla protein levels: association with vitamin K status. *Eur J Clin Invest* 2010; **40**: 344-349.
43. Williams KJ, Chen K. Recent insights into factors affecting remnant lipoprotein uptake. *Curr Opin Lipidol* 2010; **21**: 218-228.
44. Kohlmeier M, Salomon A, Saupe J, Shearer MJ. Transport of vitamin K to bone in humans. *J Nutr* 1996; **126**: 1192S-1196S.
45. Saupe J, Shearer MJ, Kohlmeier M. Phylloquinone transport and its influence on gamma-carboxyglutamate residues of osteocalcin in patients on maintenance hemodialysis. *Am J Clin Nutr* 1993; **58**: 204-208.
46. Sadowski JA, Hood SJ, Dallal GE, Garry PJ. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *Am J Clin Nutr* 1989; **50**: 100-108.
47. Reaven EP, Reaven GM. Mechanisms for development of diabetic hypertriglyceridemia in streptozotocin-treated rats. Effect of diet and duration of insulin deficiency. *J Clin Invest* 1974; **54**: 1167-1178.

4.1.10. Legends

Figure 1: Effect of nine weeks of T1DM on vascular composition of control (CTRL) and diabetic (STZ) rats. **(A)** Calcification in the aorta ($n=13/\text{group}$) and **(B)** femoral arteries ($n=13/\text{group}$). **(C)** Collagen aortic content, expressed as the percentage of aortic area stained for collagen (blue) ($n=8/\text{group}$). L: lumen, M: media, A: adventitia. Representative photomicrographs are shown. * Significantly different ($p < 0.05$) vs. control group.

Figure 2: Effect of nine weeks of T1DM on γ -carboxylation of MGP in the aorta of control and diabetic rats. **(A)** *c*MGP, as determined by immunoblotting ($n=8/\text{group}$). **(B)** *uc*MGP (red) is detectable on the elastic lamellae of aortic sections of diabetic rats, as determined by immunofluorescence staining. White arrows point to specific staining. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). L: lumen, M: media, A: adventitia. Representative photomicrographs are shown. ** Significantly different ($p < 0.01$) vs. control group.

Figure 3: Effect of nine weeks of T1DM on **(A)** γ -carboxylase expression in the aorta of control and diabetic rats, as determined by immunoblotting ($n=8/\text{group}$). Data are expressed as mean \pm SEM. *** Significantly different ($p < 0.0001$) vs. control group with an unpaired *t*-test. Relation between γ -carboxylase aortic expression and **(B)** γ -carboxylated MGP aortic expression and **(C)** aortic calcium content.

Figure 4: Effect of nine weeks of T1DM on VKOR regulation in the aorta of control and diabetic rats. **(A)** VKOR expression, as determined by immunoblotting ($n=8/\text{group}$). **(B)** VKOR microsomal activity, as determined by enzymatic assay ($n=4/\text{group}$, 7-8 rats/ n).

Figure 5: Effect of nine weeks of T1DM on plasmatic parameters in control and diabetic rats. **(A)** Concentrations of vitamin K, as determined by LC-MS/MS ($n=13/\text{group}$) and **(B)** and **(C)** concentrations of *uc*OC and *c*OC, as determined by competitive enzyme immunoassay kits ($n=15/\text{group}$). **(B)** Stacked bar graph of *uc*OC (grey) and *c*OC (black). **(C)** Ratio of *uc*OC to *c*OC. * Significantly different ($p < 0.05$) vs. control group.

Figure 6: Effect of high glucose concentration and vitamin K supplementation on aortic segments cultured *ex vivo*. **(A)** cMGP, as determined by immunoblotting ($n=10/\text{group}$). **(B)** γ -carboxylase expression, as determined by immunoblotting ($n=10/\text{group}$). **(C)** VKOR expression, as determined by immunoblotting ($n=10/\text{group}$). * Significantly different ($p < 0.05$) vs. NG and # significantly different ($p < 0.05$) vs. HG.

4.1.11. Figures

4.1.11.1. Table

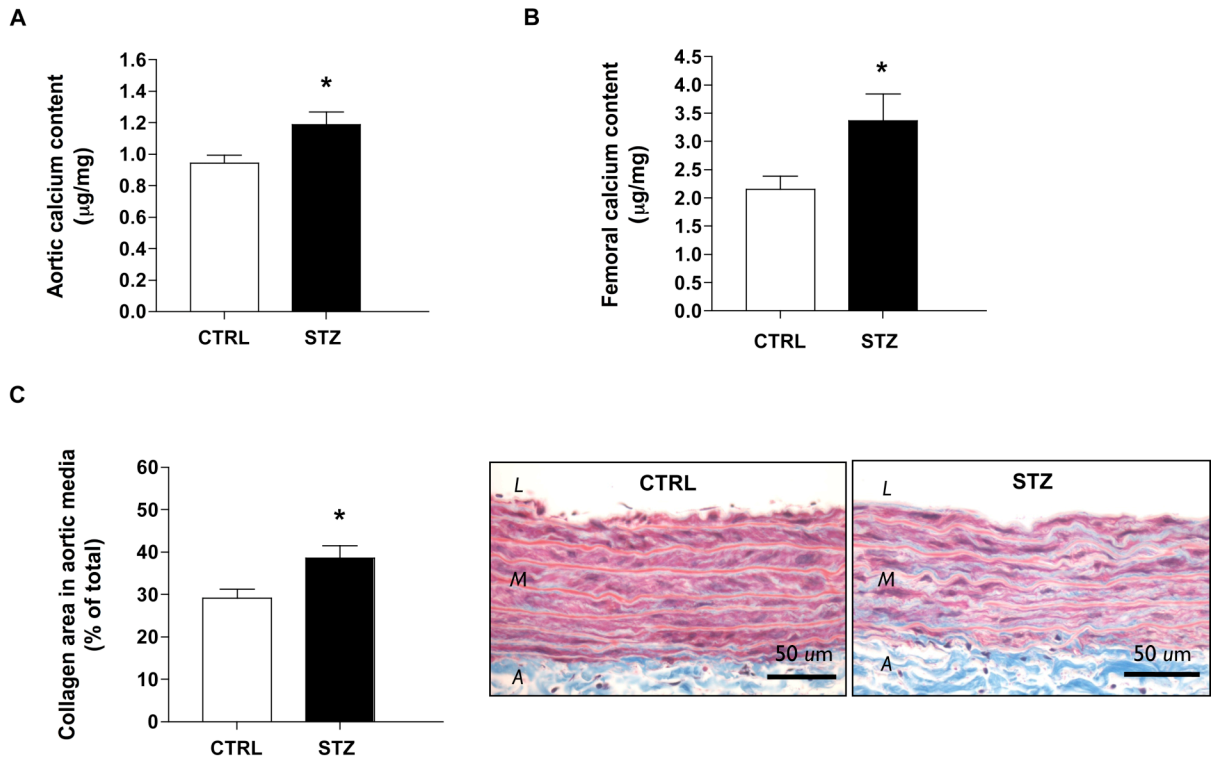
Table

Comparison of physiologic, metabolic and hemodynamic parameters between control and diabetic rats

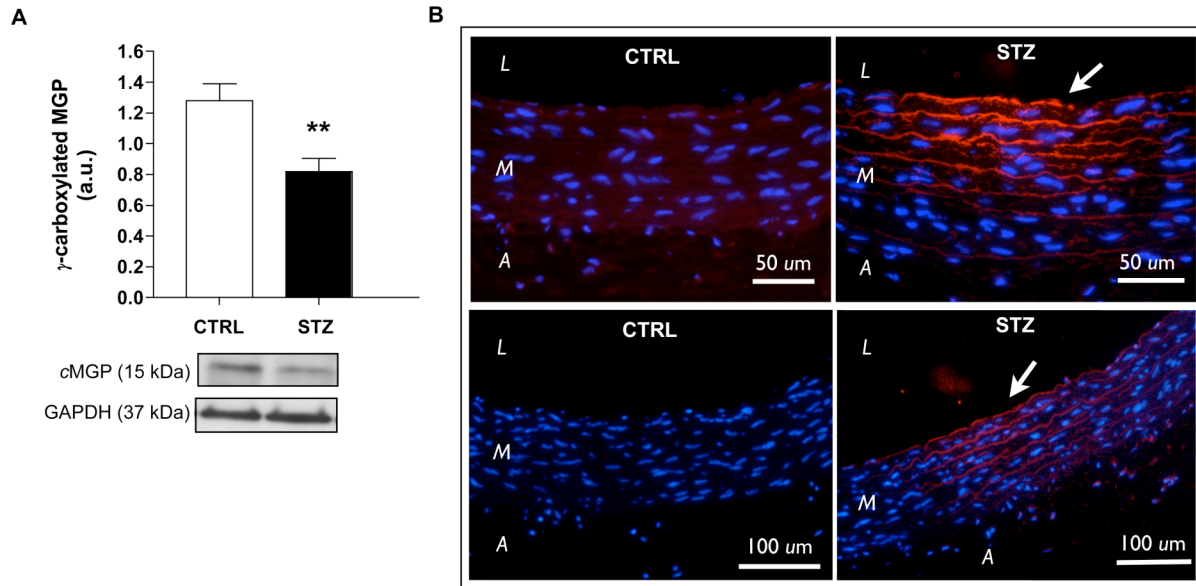
	CTRL	<i>n</i>	STZ	<i>n</i>	<i>p</i> value
Body weight (g)	525.9 ± 9.3	30	384.6 ± 12.4 ***	30	< 0.0001
Glucose (mmol/L)	5.33 ± 0.14	30	21.90 ± 1.82 ***	30	< 0.0001
Mean arterial pressure (mmHg)	131.7 ± 5.3	8	128.4 ± 5.6	8	0.682
Pulse wave velocity (cm/sec.)	854.0 ± 44.9	8	1227.0 ± 147.1 *	8	0.0295
Pulse pressure (mmHg)	33.5 ± 1.4	8	32.2 ± 2.4	8	0.642
Heart rate (bpm)	368.4 ± 14.9	30	309.4 ± 19.5 *	30	0.0308
Left ventricular mass index (mg/g)	1.77 ± 0.02	30	2.15 ± 0.04 ***	30	< 0.0001

Data are expressed as mean ± standard error of the mean; CTRL refers to control group; STZ refers to streptozotocin-treated group; * $p < 0.05$ vs. control group, *** $p < 0.0001$ vs. control group.

4.1.11.2. Figure 1

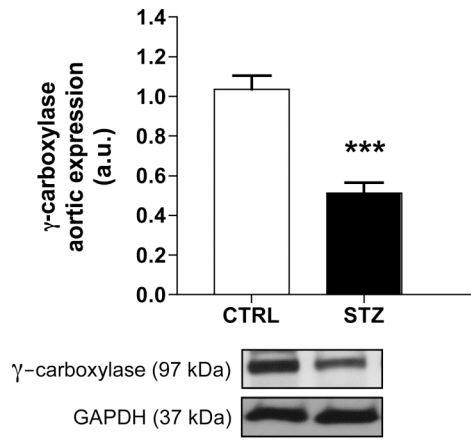


4.1.11.3. Figure 2

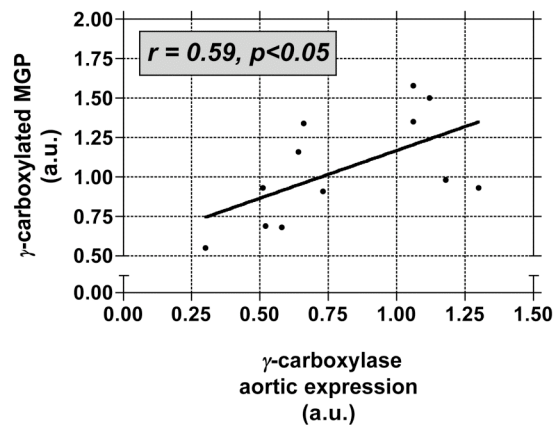


4.1.11.4. Figure 3

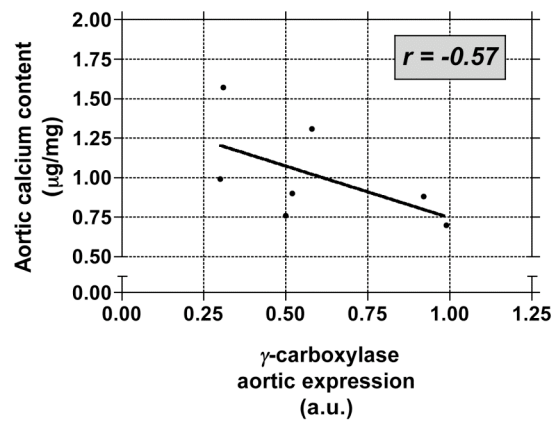
A



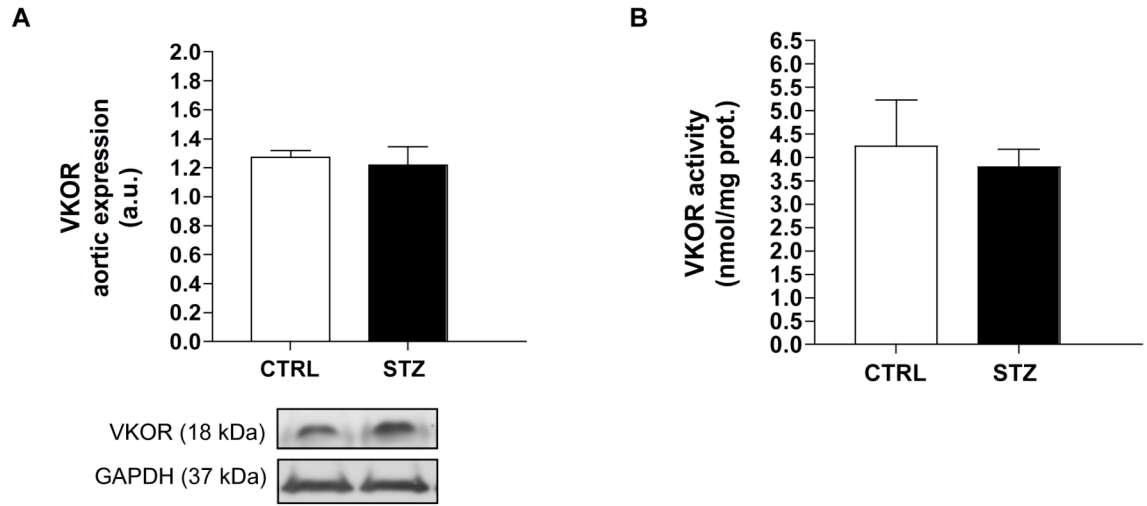
B



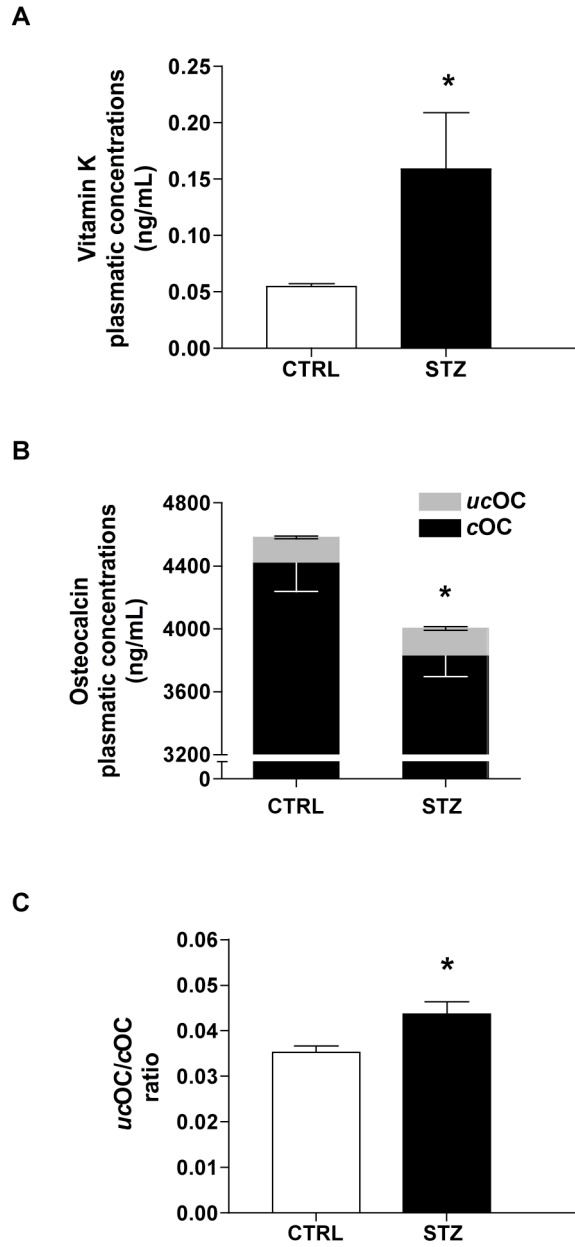
C



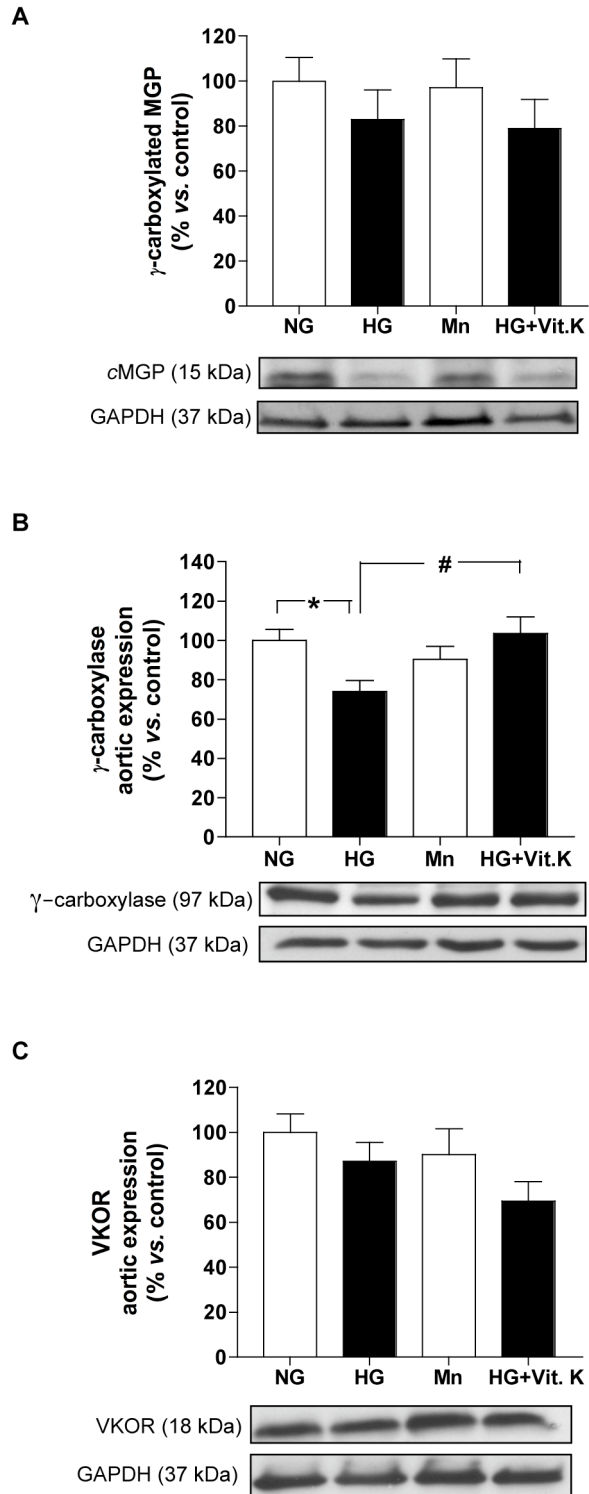
4.1.11.5. Figure 4



4.1.11.6. Figure 5



4.1.11.7. Figure 6



4.1.12. Supplementary data

4.1.12.1. Supplementary methods

4.1.12.1.1. S.1 Aortic microsomes

Samples were pulverized under liquid nitrogen, homogenized with a polytron blender for 20 seconds at a low setting in a ice-cold solution containing 0.25 M sucrose, 25 mM imidazole at pH 7.2. After centrifugation at 10 000 g for 20 minutes in a 90Ti rotor (Beckman Coulter, ON, Canada), the pellet was discarded and the *post*-mitochondrial supernatant was centrifuged in the same rotor at 100 000 g for 60 minutes. The microsomal pellet was resuspended in 25 mM sodium phosphate buffer at pH 7.85, 25 mM KCl, 20% glycerol, 0.75% CHAPS, and yielded concentrations of 2 to 3 mg/mL.

4.1.12.1.2. S.2 VKOR enzymatic activity

200 µg of microsomal protein was resuspended in 250 µL of 250 mM sodium phosphate buffer at pH 7.85 containing 0.5 M KCl, 20% glycerol, 0.75% CHAPS.2 Vitamin K epoxide at 1 mg/mL in 100% ethanol was added to a final concentration of 40 µM. DTT at a final concentration of 5 mM was added to initiate the reaction. Samples were incubated in the dark at 25°C for 30 minutes, a duration within linearity of the assay. A mixture of hexane/isopropanol (3:2) was added to stop the reaction, followed by the addition of the internal standard. Samples were vortexed for 1 minute, centrifuged at 3000 g for 5 minutes and 600 µL of the upper hexane phase was pipetted into a brown HPLC vial. The hexane phase was evaporated overnight and the residue was dissolved in 50 µL isopropanol. Vitamin K concentrations were quantified by LC-MS/MS on a TSQ Quantum Ultra from Thermo Scientific. The analysis was made in APCI-positive using the transition 451.3 – 187.1 for vitamin K and 455.3 – 191.1 for the internal standard. The column used was a Gemini C6-Phenyl, 50 x 4.6mm, 3µ by Phenomenex.

4.1.12.1.3. S.3 Vitamin K plasmatic concentrations

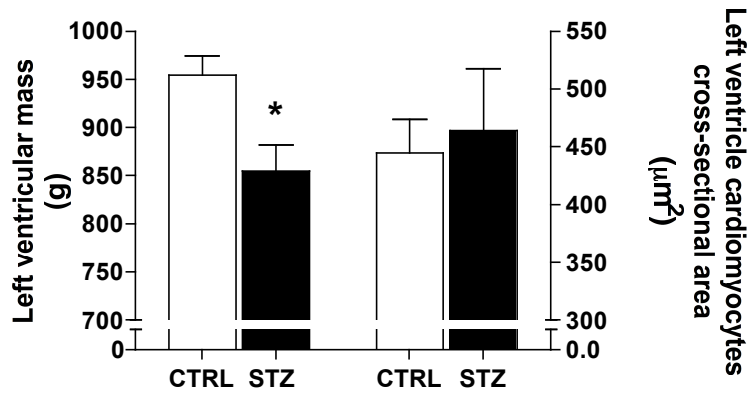
Internal standard was added to 450 μL of rat plasma to yield a concentration 0.15 ng/mL. Proteins were denatured by adding 900 μL of cold ethanol. 900 μL of water followed by 2.7 mL of hexanes were added to the samples, which were then vortexed for 3 minutes and centrifuged for 5 minutes. The supernatant was directly loaded onto a SPE cartridge (Strata SI-1 Silica, Phenomenex, CA, USA). Prior to extraction, the cartridge was conditioned with 1.6 mL of 3.5% ether in hexanes followed by 1.6 mL of hexanes. After loading, the cartridge was washed with 1.6 mL of hexanes. The analytes were then eluted with a total of 3.2 mL of 3.5% ether in hexanes. The flow-through was collected and dried under nitrogen. The sample was reconstituted in 45 μL of DCM/MeOH (2/7) prior to LC-MS analysis. Vitamin K concentrations were quantified by LC-MS/MS as described above.

4.1.12.1.4. S.4 Cardiomyocytes cross-sectional area

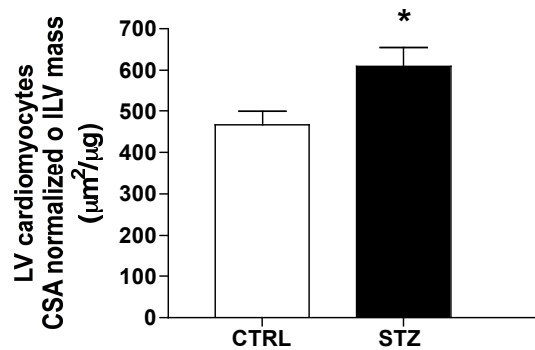
The heart was excised and the left ventricle was isolated, rinsed in PBS, blotted dry and weighed. Heamatoxylin-eosin staining was performed on frozen sections, and photomicrographs were taken at 400X. Cardiomyocyte cross-sectional areas (CSA) were evaluated on 4 sample images per left ventricle (LV) and analyzed with ImageJ (National Institute of Health, USA). A minimum of 100 cells per left ventricle were evaluated. Results are expressed as μm^2 . Cardiomyocyte CSA were then normalized to LV mass, and corresponding results are expressed as $\mu\text{m}^2/\mu\text{g}$.

Supplementary Figure 1

A



B



4.1.12.2. Supplementary Figure Legend

Figure S1. Effect of nine weeks of T1DM on LV morphology. **(A)** LV mass and cardiomyocyte CSA ($n=6/\text{group}$) and **(B)** cardiomyocyte CSA normalized to LV mass ($n=6/\text{group}$). Data are expressed as mean \pm SEM. * Significantly different ($p < 0.05$) vs. control group with an unpaired t -test.

4.1.12.3. Supplementary references

1. Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 1764-1767.
2. Wajih N, Hutson SM, Wallin R. Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *J Biol Chem* 2007; **282**: 2626-2635.

4.2. Résultats additionnels

4.2.1. Développement du modèle Vitamine D/Streptozotocine

4.2.1.1. Administration de vitamine D uniquement

Le début du projet s'est concentré sur la caractérisation du modèle basé sur l'administration de vitamine D uniquement. Pour l'étude d'une durée de 1 mois, deux doses ont été utilisées: 100 000 et 300 000 UI/kg. Le contenu en calcium s'est avéré être significativement plus élevé dans l'aorte pour chacune de ces deux doses, alors que l'augmentation n'était pas significative pour les fémorales (Figure 36A et B). Pour ce qui est de l'artère carotidienne, seulement la dose de 300 000 UI/kg a augmenté significativement la calcification par rapport au groupe contrôle (Figure 36C). L'étude histologique des vaisseaux a permis d'observer, grâce au marquage Von Kossa, la présence de calcification le long des lamelles élastiques (Figure 37). Dans le cas de l'étude d'une durée de 2 mois, aucune des doses étudiées n'a amené d'augmentation significative de la calcification comparativement aux rats témoins (Figure 36D à F). Les paramètres hémodynamiques, que ce soit la VOP, la pression systolique, la pression diastolique ou la pression pulsée n'ont pas été modifiés chez les animaux ayant reçu de la vitamine D, autant pour les groupes étudiés après 1 mois que ceux après 2 mois, à une seule exception près: la pression pulsée était augmentée significativement chez les animaux ayant reçu une dose de 300 000 UI/kg de vitamine D et sacrifiés après 1 mois comparativement aux rats contrôles (Figure 38D).

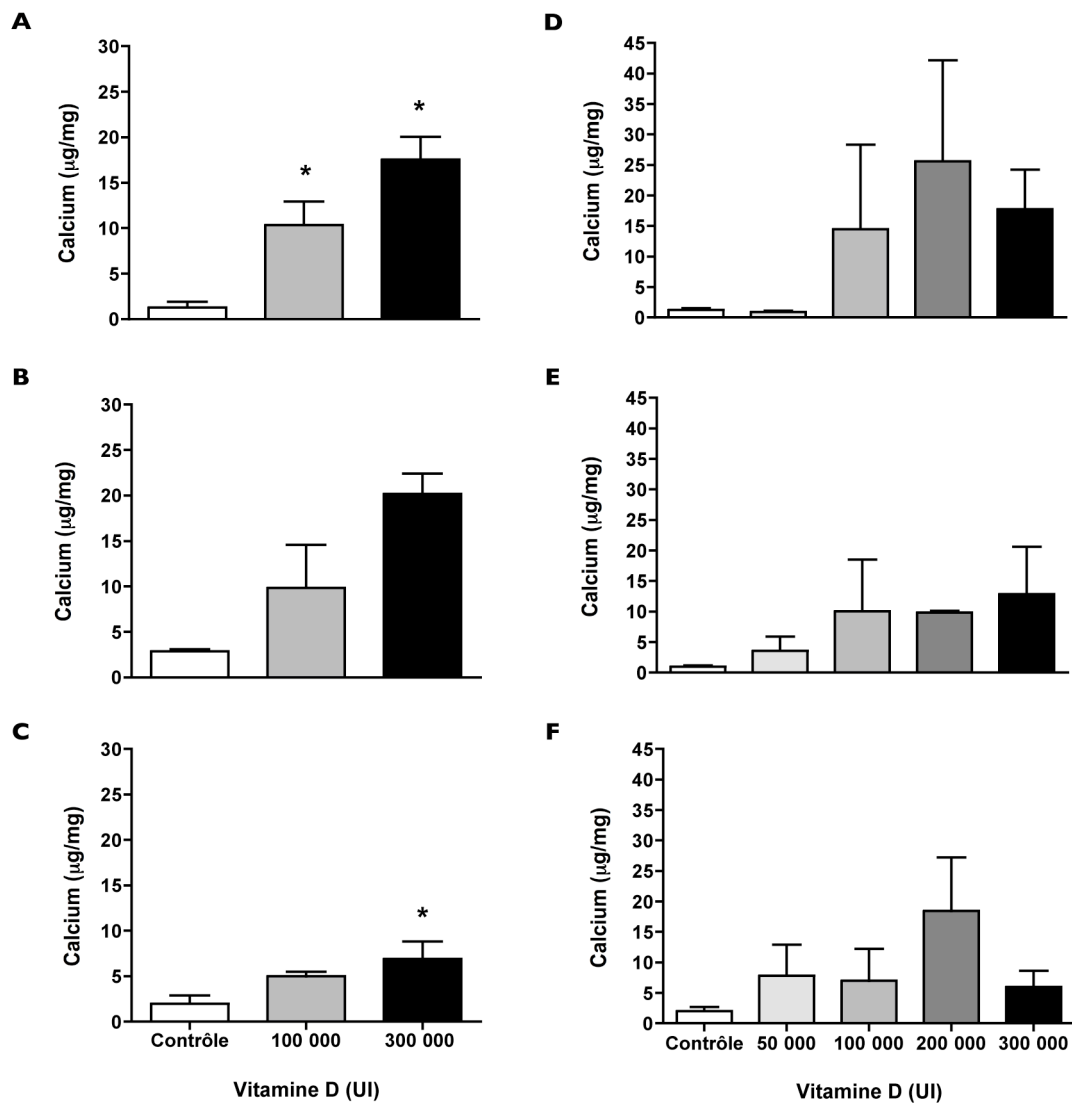


Figure 36: Effet de l'administration de vitamine D, à différentes doses, sur le contenu en calcium de diverses artères de rats Wistar sacrifiés après 1 ou 2 mois.

Pour les rats sacrifiés après 1 mois ($n=2-5/\text{groupe}$): **(A)** Contenu calcique d'une section de l'aorte, **(B)** Contenu calcique d'une section de fémorale et **(C)** Contenu calcique d'une section de carotide. Pour les rats sacrifiés après 2 mois ($n=3-5/\text{groupe}$): **(D)** Contenu calcique d'une section de l'aorte, **(E)** Contenu calcique d'une section de fémorale et **(F)** Contenu calcique d'une section de carotide. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM). * Statistiquement différent ($p < 0,05$) vs. ou ** ($p < 0,01$) groupe contrôle avec ANOVA suivi d'un *post*-test de Dunnett.

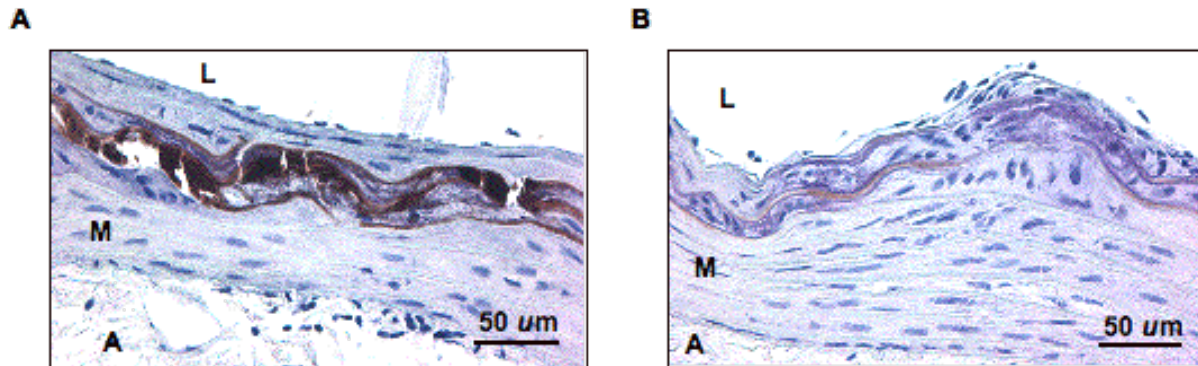


Figure 37: Marquage Von Kossa sur des coupes d'aorte thoracique de rats Wistar ayant reçu de la vitamine D à une dose de 300 000 UI et sacrifiés après 2 mois.

(A) et **(B)** Le marquage en brun est le marquage spécifique pour le calcium. Les noyaux sont marqués en bleu grâce à la coloration à l'hématoxyline. L: lumière, M: média, A: adventice.

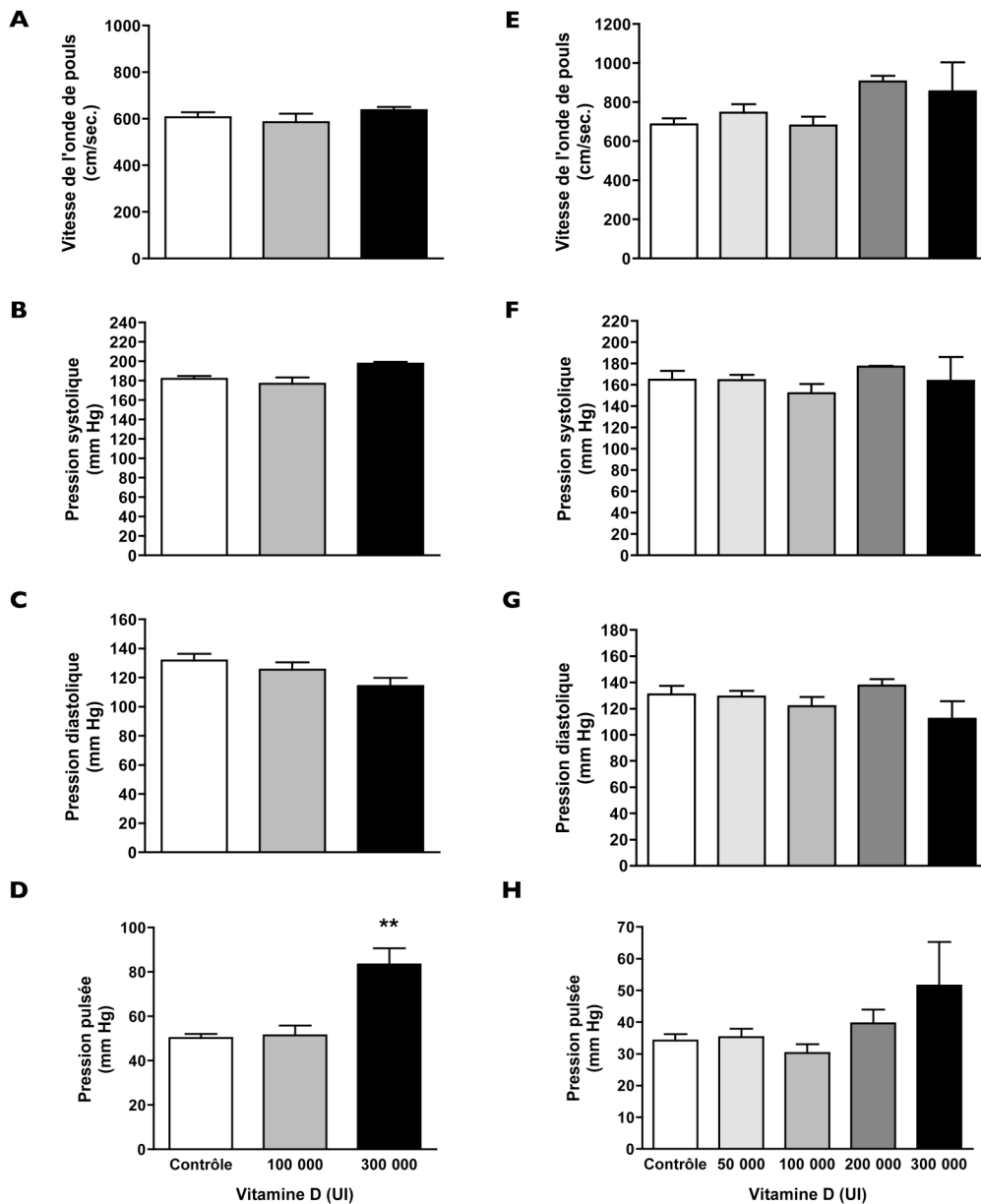


Figure 38: Effet de l'administration de vitamine D, à différentes doses, sur les paramètres hémodynamiques chez des rats Wistar sacrifiés après 1 ou 2 mois.

Pour les rats sacrifiés après 1 mois ($n=2-5$ /groupe): (A) Vitesse de l'onde de pouls, (B) pression systolique, (C) pression diastolique et (D) pression pulsée. Pour les rats sacrifiés après 2 mois ($n=3-5$ /groupe): (E) Vitesse de l'onde de pouls, (F) pression systolique, (G) pression diastolique et (H) pression pulsée. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM). ** Statistiquement différent ($p < 0,01$) vs. groupe contrôle avec ANOVA suivi d'un *post*-test de Dunnett.

4.2.1.2. Combinaison vitamine D/Streptozotocine

L'administration conjointe de la dose de 150 000 UI/kg de vitamine D et de 60 mg/kg de STZ n'a pas induit d'augmentation significative de la calcification au niveau de l'aorte, que les animaux aient été sacrifiés 1 ou 2 mois après l'administration (Figure 39). De même, aucun des paramètres hémodynamiques n'a été modifié comparativement aux rats du groupe contrôle (Figure 40).

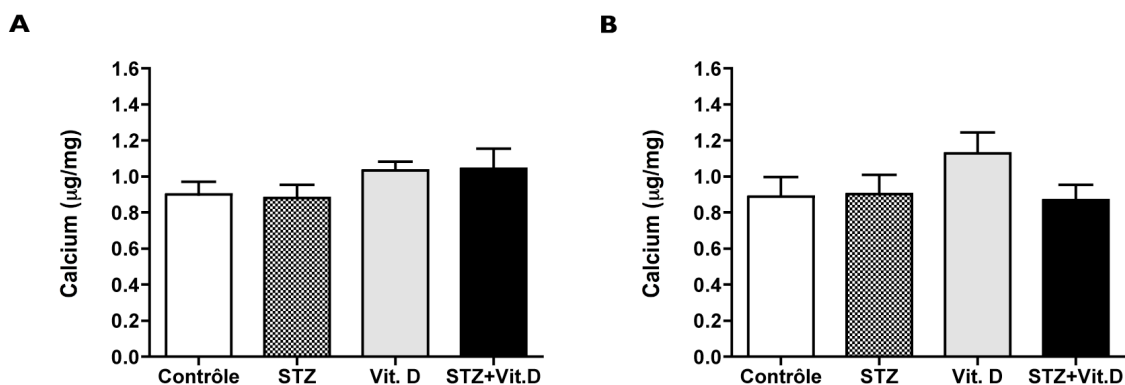


Figure 39: Effet de l'administration de vitamine D, seule ou combinée à la présence de diabète, sur le contenu en calcium de l'aorte thoracique chez des rats Wistar sacrifiés après 1 ou 2 mois.

(A) Rats sacrifiés après 1 mois ($n=5$ /groupe) et (B) rats sacrifiés après 2 mois ($n=5$ /groupe). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM). * Statistiquement différent ($p < 0,05$) vs. groupe contrôle avec ANOVA suivi d'un *post*-test de Dunnett.

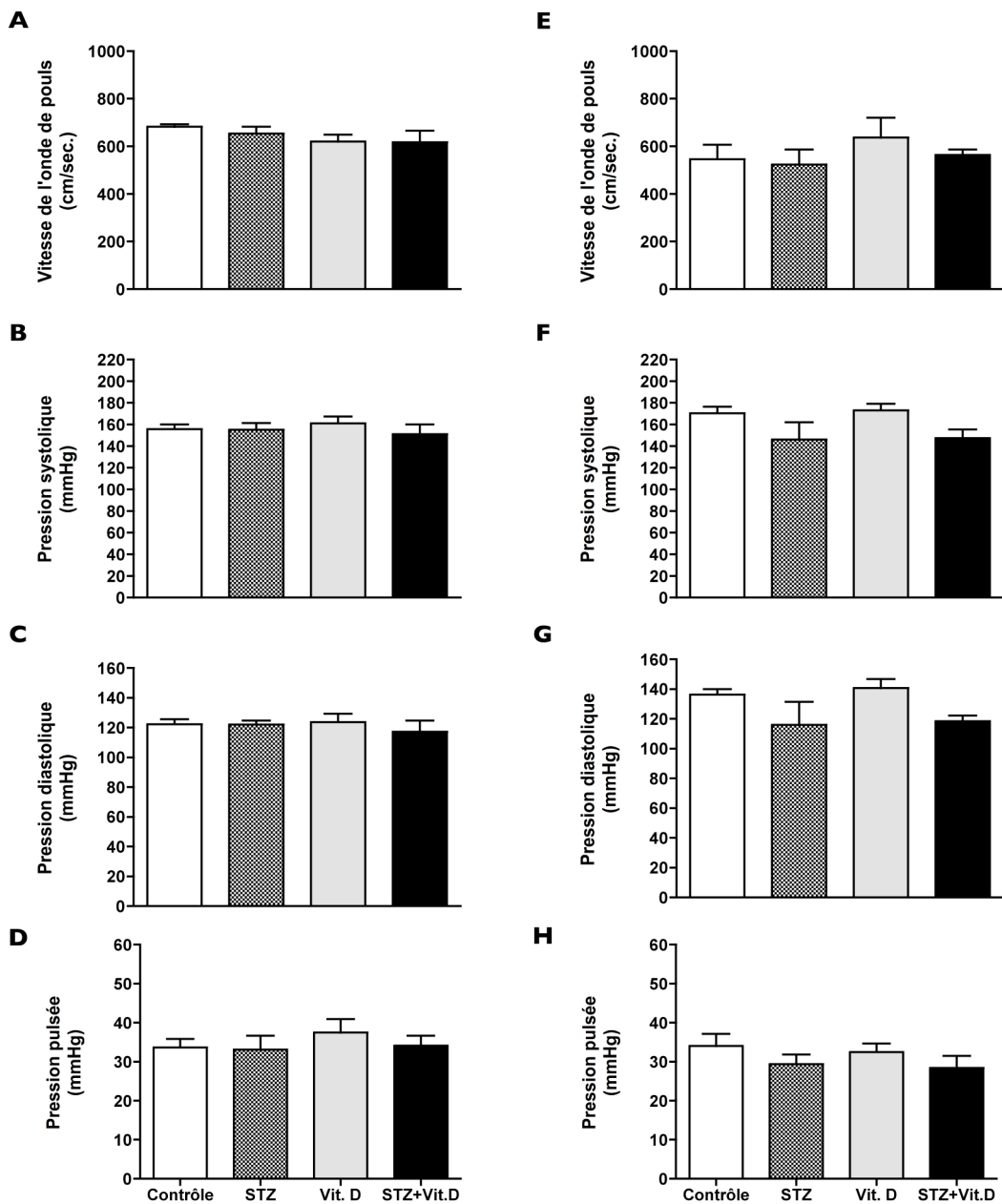


Figure 40: Effet de l'administration de vitamine D, seule ou combinée à la présence de diabète, sur les paramètres hémodynamiques des rats Wistar sacrifiés après 1 ou 2 mois.

Pour les rats sacrifiés après 1 mois ($n=5$ /groupe): (A) Vitesse de l'onde de pouls (B) pression systolique, (C) pression diastolique et (D) pression pulsée. Pour les rats sacrifiés après 2 mois ($n=5$ /groupe): (E) Vitesse de l'onde de pouls (F) pression systolique, (G) pression diastolique et (H) pression pulsée. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM).

4.2.2. MGP plasmatique

Les concentrations de MGP plasmatiques ont été diminuées de 19% chez les rats diabétiques sacrifiés après 2 mois, une différence significative comparativement aux rats du groupe contrôle (Figure 41A). L'étude de la corrélation entre la calcification aortique et les concentrations plasmatiques de MGP n'a pas permis de détecter une relation significative entre ces deux variables (Figure 41B).

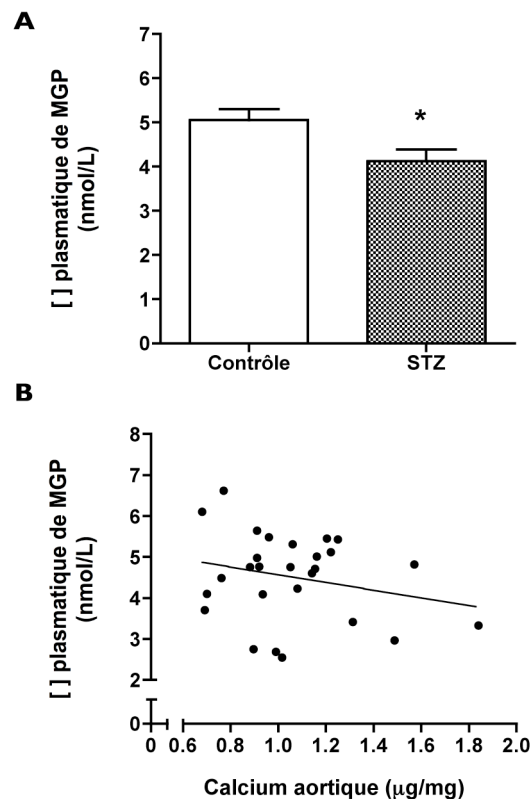


Figure 41: Effet du diabète sur les concentrations plasmatiques de MGP chez des rats Wistar, après 2 mois de diabète de type 1.

(A) Concentrations plasmatiques de MGP chez les rats contrôles ($n=12$) et les rats ayant reçu de la streptozotocine (60 mg/kg; $n=21$) et sacrifiés après 9 semaines de diabète. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM). **(B)** Corrélation entre les concentrations plasmatiques de MGP et le contenu en calcium de l'aorte thoracique ($n=27$). * Statistiquement différent ($p < 0,05$) vs. groupe contrôle avec test t de Student.

4.2.3. Identification des voies de signalisation impliquées dans l'altération de la γ -carboxylase

Lors de l'expérience pilote, il a été démontré que l'expression de la γ -carboxylase en milieu HG était diminuée de 23% par rapport à celle en milieu NG. L'inhibition de la voie PKC β par le LY333531 a prévenu cette diminution (Figure 42). En effet, une différence significative entre l'expression de la γ -carboxylase en condition HG+LY333531 par rapport à la condition HG a été observée. Aucun autre des six inhibiteurs n'a eu cet effet, quoique l'expression de la γ -carboxylase semblait augmentée en présence des inhibiteurs des voies MEK et PI3K. Par conséquent, les inhibiteurs LY333531, PD98059 et wortmannin ont été utilisés pour l'expérience suivante. La wortmannin a été choisie de façon préférentielle au LY294002 basé sur le fait qu'elle inhibe de façon irréversible la voie PI3K alors que l'effet du LY294002 est réversible.

La deuxième expérience a confirmé les résultats de la première (Figure 43). Une diminution de l'expression de la γ -carboxylase encore plus marquée a été observée, soit de 40% (*P<0.05 vs. NG). Une fois de plus, cette diminution a été prévenue par l'addition de l'inhibiteur de PKC β (# P<0.05 vs. HG), alors que l'inhibition des voies MEK et PI3K n'a pas eu d'impact sur l'expression de la γ -carboxylase.

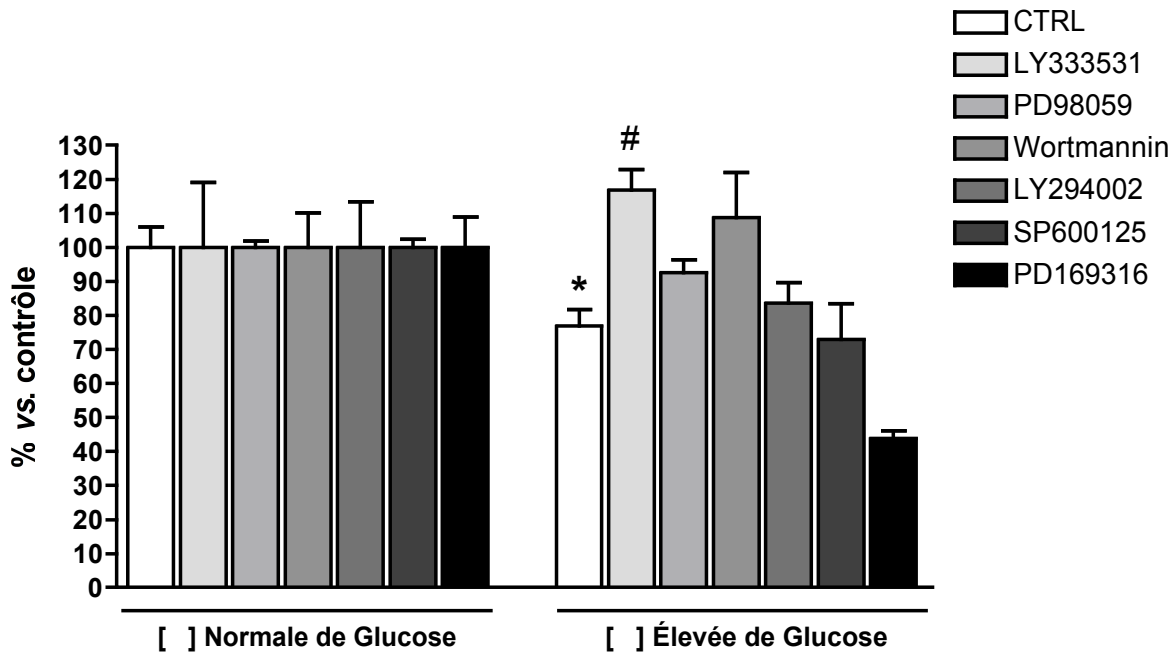


Figure 42: Effet de l'administration d'inhibiteurs de voies de signalisation sur l'expression de la γ -carboxylase en milieu hyperglycémique – Étude pilote.

Expression (unités arbitraires) de la γ -carboxylase exprimée en pourcentage vs. contrôle après incubation durant 24 heures dans les conditions décrites sur la figure ($n=4$). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM). * Statistiquement différent ($p<0,05$) vs. NG avec test t de Student. # Statistiquement différent ($P<0,05$) vs. HG avec ANOVA suivi d'un *post*-test de Dunnett.

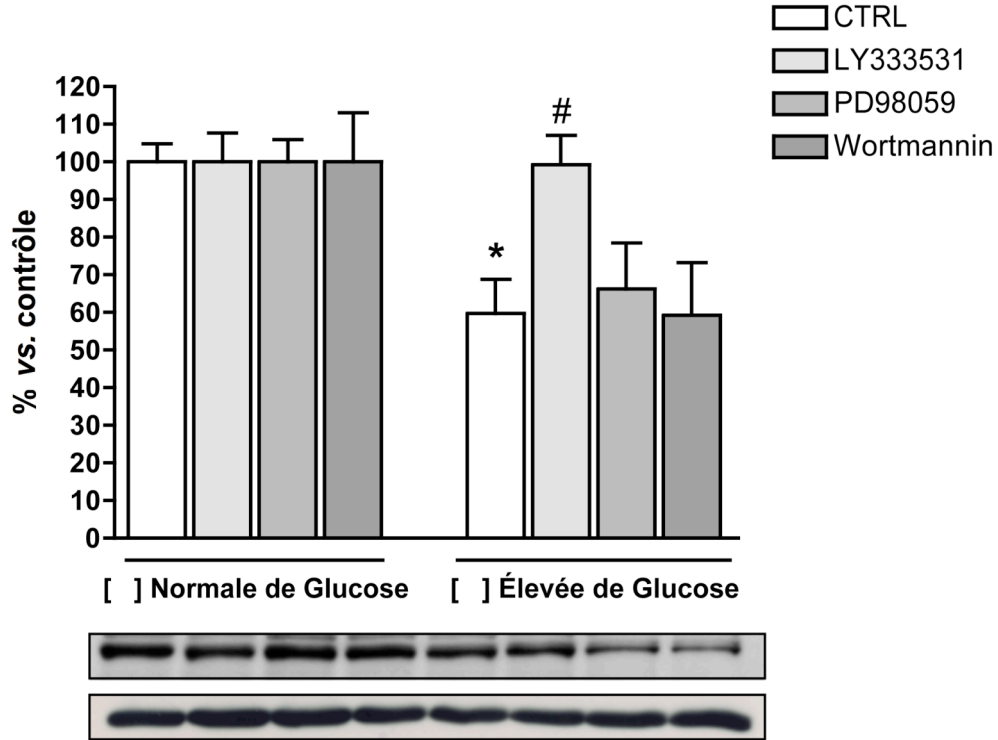


Figure 43: Identification de la voie PKC β comme voie de signalisation potentiellement impliquée dans l'altération de l'expression de la γ -carboxylase.

Expression (unités arbitraires) de la γ -carboxylase exprimée en pourcentage vs. contrôle après incubation durant 24 heures dans les conditions décrites sur la figure ($n=4$). Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM). * Statistiquement différent ($P<0,05$) vs. NG avec test t de Student. # Statistiquement différent ($P<0,05$) vs. HG avec ANOVA suivi d'un *post*-test de Dunnett.

CHAPITRE 5. Discussion et perspectives

L'HSI, amenée par l'augmentation de la rigidité vasculaire, est la forme la plus fréquente d'hypertension dans la population âgée³⁹⁰. Il est estimé qu'environ 80% des personnes âgées de plus de 60 ans hypertendues, non-traitées ou traitées inadéquatement, souffrent en fait d'HSI^{69,391}. Par ailleurs, sa prévalence est environ trois fois plus élevée chez les patients diabétiques comparativement aux personnes non-diabétiques³³². Cette augmentation de la rigidité vasculaire, causée en partie par la calcification aortique médiale, est accélérée de 15 ans chez les diabétiques³⁹² et est considérée comme étant le plus important prédicteur de la mortalité cardiovasculaire chez les diabétiques^{393,394}. Quelle est la problématique reliée aux traitements actuels, et quelles pourraient être les avenues thérapeutiques potentielles en sachant ce qui a été couvert dans cette thèse? C'est ce qui sera abordé dans les prochaines sections.

5.1. Rappel du besoin thérapeutique

La thérapie de première ligne pour traiter l'HSI consiste présentement en l'utilisation d'agents antihypertenseurs, même chez les patients diabétiques. Leur effet bénéfique repose principalement sur l'amélioration de la vasodilatation périphérique et la diminution de la PAM. Or, ils ne ciblent pas directement les composantes pathologiques affectant les gros troncs artériels et par conséquent, leur efficacité à améliorer la rigidité artérielle et ainsi réduire le risque cardiovasculaire qui y est associée est mitigée³⁹⁵. Il est à noter que certaines classes d'agents antihypertenseurs ou certaines combinaisons s'avèrent plus efficaces que d'autres pour le traitement de la rigidité artérielle, parfois même indépendamment de la PAM^{396,397}. Il n'en reste pas moins que plus des deux tiers des patients diabétiques doivent recourir à plus de deux médicaments afin d'atteindre les valeurs cibles de pression artérielles³⁹³ et que seulement 35% des patients diabétiques traités avec des hypertenseurs atteignent la cible prescrite de < 130/80 mmHg³⁹⁸. D'ailleurs, plus le nombre de facteurs de risque présents chez un même individu est élevé, moins le contrôle de sa pression artérielle est efficace³⁹⁹.

Ces constatations nous amènent à la problématique de la résistance aux agents antihypertenseurs. Cette résistance est retrouvée principalement chez les patients âgés et les diabétiques, cette population même qui est à risque pour le développement de la rigidité vasculaire^{400,401}. En fait, il est maintenant établi qu'une pression systolique élevée est une caractéristique de la résistance au traitement antihypertenseur. Il a également été démontré que la VOP mesurée au moment de l'enrôlement dans le protocole de recherche prédisait la réponse au traitement antihypertenseur et ce, même lorsque plusieurs médicaments étaient utilisés en combinaison⁴⁰². Il semble donc qu'il existe bel et bien un lien entre la rigidité vasculaire et la résistance au traitement antihypertenseur.

Encore plus pertinent dans le cadre de nos recherches est le fait que les patients avec une HSI résistante au traitement antihypertenseur ont davantage de calcification aortique que ceux répondant au traitement³⁹⁵. Ce résultat appuie l'hypothèse que la rigidité artérielle, et plus spécifiquement la dégénérescence des propriétés élastiques des gros troncs artériels amenée en partie par la calcification artérielle, serait responsable de la résistance aux agents antihypertenseurs actuels chez les patients souffrant de HSI³⁹⁵. Il est maintenant bien établi que la rigidité artérielle doit être considérée comme une cible thérapeutique à part entière, plutôt que de se contenter de traiter l'HSI simplement comme une PAM élevée, et il en découle la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant directement la calcification artérielle.

Par contre, tel que décrit dans cette thèse, les traitements actuels ayant le potentiel de cibler la calcification artérielle sont limités et peu spécifiques. Les thérapies servant à contrôler la glycémie ne sont pas suffisantes pour éviter le développement des complications cardiovasculaires⁴⁰³. La réalisation de cette thèse de doctorat nous a donné l'opportunité de s'attarder à cette problématique et d'approfondir les connaissances liées à la calcification artérielle qui se développe de façon accélérée chez les personnes diabétiques dans l'espoir d'identifier une cible thérapeutique potentielle.

5.2. Point de mire: la MGP et les enzymes impliquées dans son activation

Étant donné les résultats récents publiés dans la littérature scientifique concernant la MGP, notre intérêt et nos efforts se sont portés sur cette protéine et sur les différents éléments qui influencent sa régulation. Les résultats des recherches effectuées dans d'autres laboratoires nous indiquaient que c'est la forme γ -carboxylée qui semble être en mesure de lier le calcium et d'inhiber le développement de la calcification dans la paroi vasculaire et qu'ainsi, cette forme était la forme active de la protéine. Quels sont les éléments-clés qui influencent la transformation de la forme inactive de la MGP à sa forme active? L'enzyme directement responsable de la γ -carboxylation évidemment, soit la γ -carboxylase, et le co-facteur de cette réaction, soit la vitamine K sous sa forme réduite. Le fait que la vitamine K doit impérativement être disponible à la γ -carboxylase sous sa forme réduite ajoute un troisième élément-clé à l'équation, soit la VKOR, l'enzyme responsable de cette réaction de réduction. La MGP, la γ -carboxylase, la vitamine K et finalement la VKOR ont donc été le point central de nos recherches avec l'objectif de déterminer leur implication respective dans l'accélération du développement de la calcification vasculaire associée au T1DM.

5.2.1. Développement du modèle

Tout d'abord, un modèle adéquat de rigidité artérielle associée au T1DM devait être choisi pour vérifier nos hypothèses. Les résultats obtenus avec l'administration de vitamine D uniquement étaient à première vue prometteurs. L'augmentation de la calcification aortique était proportionnelle à la dose dans le cas des animaux sacrifiés après 1 mois, et cette calcification était clairement associée aux lamelles élastiques. Par contre, cette calcification n'a pas influencé les paramètres hémodynamiques tel que l'on aurait pu s'y attendre. En effet, une calcification de cette ampleur se traduit habituellement par une augmentation de la rigidité vasculaire d'après ce qui est observé dans le cas du modèle WVK. Nous avons tout de même poursuivi avec le développement de ce modèle, en comptant sur le fait que la combinaison avec la STZ pourrait résulter en un effet additif ou synergique sur la calcification vasculaire et

l'augmentation de la rigidité vasculaire. Nous avons choisi la dose intermédiaire de 150 000 UI de vitamine D pour l'administration future avec la STZ.

L'expérience avec le développement du modèle combinant l'administration de vitamine D et de STZ ne nous a malheureusement pas fourni les résultats escomptés. D'une part, il n'était pas satisfaisant du point de vue de la survie des animaux. D'autre part, malgré le fait que les résultats initiaux obtenus avec l'administration de vitamine D seule nous avaient permis de nous attendre à une augmentation de la calcification aortique et possiblement à une modification des paramètres hémodynamiques due à la présence du diabète, ces changements n'ont tout simplement pas été observés lors de l'administration combinée de la vitamine D et de la STZ, soulevant le problème de la reproductibilité. Une explication possible est que ce manque de reproductibilité pourrait être attribuable à la difficulté d'obtenir un mélange homogène lors de la dissolution de la vitamine D dans le véhicule.

Un second aspect à prendre en considération était la possibilité que la vitamine D puisse influencer la régulation de la MGP. En effet, tel que mentionné dans l'introduction à la section 1.3.6, les résultats de certaines études laissent croire qu'une telle interaction pourrait être possible, notamment en raison des sites de liaison pour la vitamine D que possèderaient certaines séquences du gène codant pour la MGP. Malgré le fait que ce ne sont pas tous les résultats qui pointent vers une telle modulation de la MGP par la vitamine D, cet aspect, jumelé au manque de reproductibilité des niveaux de calcification vasculaire obtenus et à la possibilité que l'administration de vitamine D puisse influencer la γ -carboxylase tel que démontré chez les rats au niveau rénal, nous a convaincu de concentrer nos efforts sur un modèle différent.

C'est ainsi que nous nous sommes tournés vers le modèle avec administration de STZ uniquement. Nous n'avions à ce moment aucune idée de la durée nécessaire pour que les animaux souffrant de T1DM développent de la calcification vasculaire et aient une augmentation de la rigidité artérielle, s'il était éthiquement possible de conserver les animaux diabétiques pour une durée suffisamment longue pour que ces changements surviennent, et même si effectivement le modèle chez le rat allait évoluer de façon similaire à la pathologie

humaine. Nous avons donc fixé deux durées d'étude afin d'étudier l'évolution dans le temps de nos critères principaux, soit l'augmentation de la VOP et des concentrations de calcium dans la paroi vasculaire. Chez les animaux sacrifiés après un mois, il n'a pas été possible de détecter des changements pour ce qui est de ces deux critères. Par contre, une durée de diabète de deux mois a mené à une modification des paramètres critiques, soit l'augmentation de la VOP et du contenu en calcium au niveau aortique et fémoral. L'augmentation du contenu calcique dans l'aorte et les fémorales était par contre plutôt faible par rapport à celle observée dans le modèle WVK fréquemment utilisé dans notre laboratoire. Sachant qu'après un mois aucune différence n'était détectable, nous avons conclu que les changements observés après deux mois étaient des changements précoces, à un moment où la calcification commençait à s'installer. Ces changements précoces constituaient en quelque sorte un avantage, puisque nous allions pouvoir étudier les protéines d'intérêt au tout début du développement de la calcification, à un moment où elles étaient activement impliquées et sollicitées pour contribuer à l'évolution de la pathologie, par opposition au moment où la calcification est déjà bien installée.

La hausse du contenu en collagène dans l'aorte confirme le fait que plusieurs facteurs contribuent à l'augmentation de la rigidité vasculaire, et que ce phénomène est multifactoriel. L'augmentation de la déposition de collagène dans les vaisseaux diabétiques serait attribuable à l'activation de la voie de signalisation des Smads suite à l'interaction des AGEs avec leur récepteur RAGE⁴⁰⁴. Le collagène est aussi très susceptible à la glycation non-enzymatique étant donné sa longue demi-vie. Ce collagène glyqué est plus rigide, et il moins facilement hydrolyzable que le collagène non-glyqué, ce qui résulte en son accumulation dans la paroi vasculaire⁴⁰⁵. De plus, l'activation de la voie PKC en condition d'hyperglycémie est associée à l'accumulation de collagène⁴⁰⁶. Par contre, il est important de préciser qu'aucune relation entre la MGP ou la γ -carboxylase et l'accumulation de collagène n'a jusqu'à ce jour été reportée dans la littérature. Il est connu que dans les lésions athérosclérotiques la MGP est associée aux sites de calcification, alors qu'elle n'est pas détectée dans les régions fibrosées⁴⁰⁷. Nous avons donc conclu que la déposition de collagène était indépendante de la modulation de la MGP et de la γ -carboxylase. Notre modèle est un bel exemple de l'impact de la contribution relative des différents éléments qui composent la paroi artérielle sur la rigidité vasculaire. En bref, puisque

nos critères de l'augmentation de la VOP et du contenu en calcium des vaisseaux ont été rencontrés, nous avons considéré ce modèle comme étant adéquat pour la poursuite de nos recherches.

5.2.2. MGP

Les résultats obtenus lors de l'étude de ce modèle nous ont permis de démontrer que la quantité de MGP γ -carboxylée retrouvée au niveau aortique étant inférieure chez les animaux diabétiques comparativement aux animaux sains. À notre connaissance, c'est la première fois que cette diminution de la forme fonctionnelle de la MGP dans la paroi aortique est démontrée en termes de quantification protéique et qui plus est, dans le contexte de la rigidité artérielle associée au diabète. Cette diminution est tout à fait en ligne avec l'hypothèse voulant que puisque c'est la forme γ -carboxylée qui lie le calcium et l'empêche de former les cristaux d'hydroxyapatite dans la paroi vasculaire, une diminution de la forme γ -carboxylée entraînerait alors une augmentation de la calcification artérielle. De plus, il est intéressant d'observer cette diminution à un stade précoce du développement de la calcification, alors que la déposition de calcium est encore minime, ce qui permet de suggérer que la diminution de la quantité de MGP γ -carboxylée pourrait être une des causes, plutôt qu'une conséquence du développement de la calcification. Il n'a pas été possible de détecter un signal quantifiable par *western blot* pour ce qui est de la MGP non-carboxylée. Cependant, l'analyse immunohistochimique a permis de mettre en évidence une accumulation de la MGP non-carboxylée, directement sur les lamelles élastiques du vaisseau. Le fait que cette accumulation se produise à cet endroit en particulier n'est pas inattendu puisqu'il est en accord avec nos connaissances sur le développement de la calcification artérielle à savoir que le lieu privilégié de nucléation de l'hydroxyapatite se situe justement au niveau des lamelles élastiques, là où le calcium se fixe aux microfibrilles des fibres d'élastine. Le désordre de γ -carboxylation, et par conséquent la perte de fonctionnalité de la MGP, semble donc avoir été mis en évidence de façon convaincante dans ce modèle murin de rigidité artérielle en présence de diabète.

5.2.2.1. MGP plasmatique

Pour ce qui est de la MGP circulante, il n'était possible de mesurer que les concentrations plasmatiques de MGP sans égard à sa γ -carboxylation. Nos résultats ont démontré une nette diminution de celles-ci, quoique l'interprétation d'un tel résultat est difficile. Nous avons tenté de mettre ces résultats en relation avec la calcification aortique, mais le lien entre ces deux variables était faible ($n = 27$; $r = 0.25$). Notre hypothèse pour expliquer la diminution des concentrations de la MGP est qu'elle pourrait s'accumuler au niveau des zones de calcification afin d'empêcher la nucléation de cristaux d'hydroxyapatite, et qu'elle n'est donc pas libre de circuler dans le plasma. À défaut de pouvoir déterminer avec exactitude la cause de cette diminution, il est encore possible d'envisager que les concentrations de MGP totales pourraient servir de biomarqueur pour la calcification artérielle, mais davantage d'études seront nécessaires pour évaluer ce potentiel adéquatement puisque les résultats obtenus jusqu'à présent chez l'humain sont variables³⁶³. Il aurait été particulièrement intéressant de pouvoir étudier les concentrations plasmatiques de MGP γ -carboxylée chez les rats diabétiques et contrôles afin d'évaluer si, tout comme nous l'avons démontré pour l'OC, ces dernières sont diminuées en présence de diabète.

5.2.3. γ -carboxylase

Nous avons par la suite évalué l'expression de la γ -carboxylase dans l'aorte des rats, afin de déterminer si elle était modulée par la présence de diabète. Nos résultats ont démontré la réduction marquée de près de 60% de l'expression de celle-ci dans la paroi vasculaire, et ce, à un stade précoce de la calcification. Pour ce qui est des mesures de l'activité de la γ -carboxylase, les résultats obtenus lors de la mise au point de la méthode ne permettaient pas d'obtenir des résultats concluants dû à la grande variabilité de cet essai enzymatique. Parmi les facteurs qui pourraient expliquer cette variabilité est le fait que le FLEEL se lie à la γ -carboxylase faiblement, avec un K_m de 5 à 10 mmol/L⁴⁰⁸. De plus, dans le cas d'un essai effectué sur des microsomes aortiques, il est rapporté qu'il faut environ huit fois plus de protéines microsomales que nécessaire dans le cas des microsomes hépatiques afin d'obtenir

un taux de γ -carboxylation similaire¹⁹⁰. Finalement, il est suggéré que la γ -carboxylase co-précipite avec le collagène lors de l'extraction des microsomes aortiques, ce qui peut potentiellement réduire l'activité de la γ -carboxylase¹⁹⁰. D'un autre côté, la très faible quantité de microsomes aortiques disponibles rendait impossible la réalisation de deux tests d'activité, c'est-à-dire un pour la γ -carboxylase et l'autre la VKOR. Il a donc été décidé que la totalité des microsomes serait utilisée pour mesurer l'activité de la VKOR. En effet, puisque l'expression de la γ -carboxylase était diminuée de façon marquée, il était vraisemblable d'imaginer que son activité le serait aussi. Pour vérifier cette hypothèse, les mesures d'expression et d'activité ont été effectuées avec du tissu hépatique et la relation entre ces deux variables a été évaluée. Nous avons ainsi pu déterminer que l'expression de la γ -carboxylase hépatique était proportionnelle à son activité ($n = 8$; $r = 0.55$), et nous avons supposé qu'une relation similaire pouvait se retrouver au niveau du tissu aortique également. Nos résultats nous ont permis de conclure que la forte diminution de l'expression de la γ -carboxylase était fort probablement impliquée dans la diminution de la γ -carboxylation de la MGP.

5.2.4. VKOR

Qu'en était-il du rôle de la VKOR? D'après les résultats obtenus lors de nos recherches *in vivo*, il ne semble pas qu'elle soit impliquée dans le développement de la rigidité artérielle liée au diabète, et de façon plus précise, dans l'altération de la γ -carboxylation de la MGP puisque ni son expression ni son activité ne sont modulées en présence de diabète. Ainsi, nos résultats suggèrent que la VKOR est en mesure de recycler la vitamine K adéquatement. Par contre, que savons-nous à propos de la biodisponibilité de la vitamine K? La VKOR a-t-elle accès à une quantité suffisante de substrat? Le fait que les concentrations plasmatiques de vitamine K soient triplées chez les animaux diabétiques laissent supposer qu'une altération dans le métabolisme et/ou la capture de la vitamine K pourrait exister. Ainsi, il est envisageable de penser que moins de vitamine K serait disponible au niveau du tissu cible, soit le tissu vasculaire, lui-même endommagé par la présence du diabète. Il serait particulièrement intéressant de vérifier cette hypothèse en mesurant la concentration de vitamine K dans la

paroi aortique. Toutefois, si les concentrations tissulaires de vitamine K de la paroi vasculaire étaient bel et bien plus faibles, il aurait été attendu que la diminution du substrat conduise à une diminution de l'expression de l'enzyme, ce qui n'a pas été observé. Ces interrogations pourraient servir de tremplin à des recherches approfondies sur l'implication possible de la vitamine K dans la pathologie, soit au niveau de son métabolisme, de son transport ou encore de sa capture par le tissu cible. Le potentiel thérapeutique d'une supplémentation en vitamine K reste lui aussi à évaluer, mais la réponse à ces interrogations pourrait apporter un éclairage nouveau sur ce potentiel.

5.2.5. Modèle *ex vivo*

Par la suite, le développement du modèle *ex vivo* nous a permis de confirmer l'impact de l'hyperglycémie *per se* sur l'expression de la γ -carboxylase. En utilisant des anneaux d'aortes prélevées chez des rats sains et en les incubant dans un milieu NG ou HG, nous avons mis en évidence une fois de plus la réduction de près de 30% de l'expression de la γ -carboxylase en présence d'hyperglycémie comparativement au milieu contrôle. De façon surprenante, la supplémentation en vitamine K a prévenu cette diminution d'expression, suggérant un lien possible entre ces deux composantes du système de γ -carboxylation de la MGP. Cet effet de la vitamine K dans le modèle *ex vivo* pourrait découler de deux éléments en particulier: en premier lieu, la simplicité du modèle fait en sorte que la vitamine K a un accès direct au tissu, et en deuxième lieu, le tissu aortique sain, c'est-à-dire non affecté par le diabète depuis 9 semaines, permettrait la capture adéquate de la vitamine K. Ces deux éléments propres au modèle *ex vivo* appuient notre hypothèse voulant que l'altération du métabolisme et/ou de la capture de la vitamine K dans le modèle *in vivo* pourrait mener aux concentrations élevées de vitamine K observées *in vivo* et à l'incapacité subséquente de la vitamine K à être utilisée adéquatement par le tissu cible. Par contre, les doses utilisées dans le modèle *ex vivo* étaient de l'ordre de 20 $\mu\text{g/mL}$, comparativement aux concentrations circulantes chez les rats qui dans notre cas se situaient aux alentours de 0.1 ng/mL . Il faut donc rester prudent quant à l'interprétation des résultats obtenus pour la supplémentation en vitamine K dans le milieu de

culture. Une courbe dose-réponse pourrait être intéressante à réaliser pour évaluer à quelle dose minimale l'effet est observable et si cette concentration est atteignable *in vivo* suite à une supplémentation en vitamine K.

5.2.6. PKC: la voie de signalisation impliquée dans la modulation de la γ -carboxylase en présence de diabète

Quelles sont les voies de signalisation impliquées dans la réduction de l'expression de la γ -carboxylase? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le modèle *ex vivo* auquel nous avons ajouté différents inhibiteurs de voies signalétiques. La voie qui a été identifiée comme étant possiblement impliquée dans l'altération de la γ -carboxylase est la voie de la PKC, et plus spécifiquement de l'isoforme β . Ce résultat est fort intéressant puisqu'il est reconnu que cette voie est induite en condition HG (Figure 44), et a déjà été identifiée comme jouant un rôle dans les dommages aux organes-cibles associés au diabète. La PKC est une sérine/thréonine kinase dont l'activation nécessite la contribution du calcium et/ou de la phosphatidylsérine et/ou du diacylglycérol, dépendant de l'isoforme. En effet, douze isoformes ont été identifiées jusqu'à maintenant et ces dernières sont classées selon leur structure et le ou les co-facteur(s) nécessaire(s) à leur activation. Il existe les isoformes conventionnelles (α , β I, β II et γ), nouvelles (δ , ϵ , η et θ) et atypiques (ζ et ι/λ). La voie de signalisation diacylglycérol (DAG)-PKC est entre autres impliquée dans la régulation de la perméabilité endothéliale, la synthèse de MEC et l'angiogénèse, des mécanismes reconnus pour être altérés en présence de diabète. La formation de DAG est dépendante de différentes cascades de signalisation, incluant la conversion de PIP2 en IP3 par la phospholipase C (PLC), et la synthèse *de novo* à partir d'un produit de métabolisation du glucose, le glyceraldehyde-3-phosphate (Figure 44). Par contre, plusieurs études ont démontré que la formation de DAG induite par la PLC ne semble pas être impliquée dans les complications diabétiques. En contraste, la synthèse *de novo* du DAG menant à l'activation de la PKC dans les CMLV a été confirmée⁴⁰⁹. Chez les rats STZ en particulier, une augmentation de la synthèse *de novo* de DAG, de l'activité de la PKC et de l'expression de l'isoforme PKC β II au niveau du cœur et de l'aorte a été observée⁴¹⁰.

À l'aide d'un modèle de chiens diabétiques, il a été démontré que les niveaux de DAG demeurent élevés même après cinq ans de diabète⁴⁰⁹. Finalement, parmi les deux isoformes détectées dans l'aorte de ces rats, soit la α et la β , seulement la β est activée par la présence de diabète.

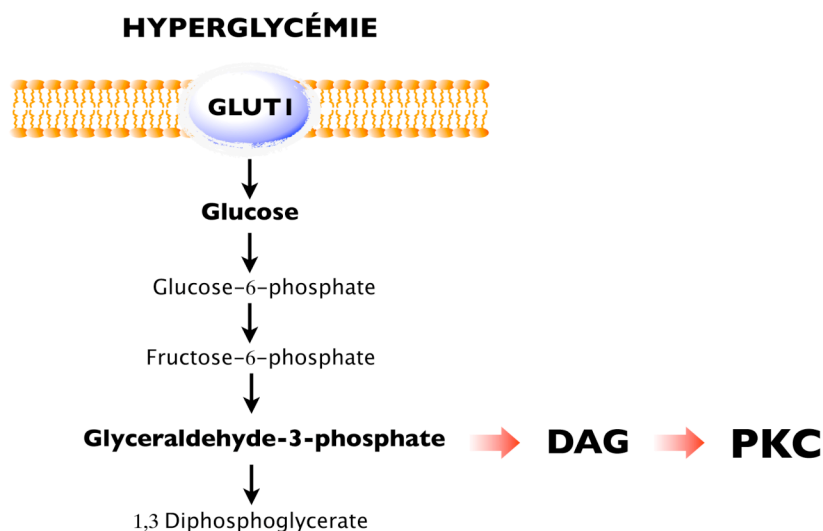


Figure 44: Synthèse *de novo* du DAG en présence d'hyperglycémie, menant à l'activation de la PKC.

5.3. Avenues thérapeutiques potentielles

5.3.1. Molécules ciblant la voie PKC

La voie PKC β est donc la voie qui a été identifiée comme étant impliquée dans la réduction de l'expression de la γ -carboxylase en milieu HG. Cette altération mènerait à une diminution de la quantité de MGP γ -carboxylée, *i.e.* active, dans la paroi aortique, favorisant ainsi un milieu propice à la calcification. La voie PKC β représente ainsi une cible thérapeutique potentielle, puisque son inhibition pourrait restaurer la quantité de MGP active

dans l'aorte, et servir de thérapie pour le traitement des complications macrovasculaires associées au diabète, comme l'augmentation de la rigidité vasculaire.

Le potentiel thérapeutique de l'inhibition pharmacologique de cette voie a été étudié auparavant pour le traitement de complications microvasculaires amenées par le diabète, avec des résultats qui semblaient être très prometteurs. Des études ont en effet été menées chez des animaux et même chez des humains avec le LY33531, une molécule biodisponible qui inhibe sélectivement les isoformes PKC β I et PKC β II, et qui a été caractérisée au début des années 2000⁴¹¹ (Figure 45). Cet inhibiteur est le même que celui utilisé dans notre modèle *ex vivo*.

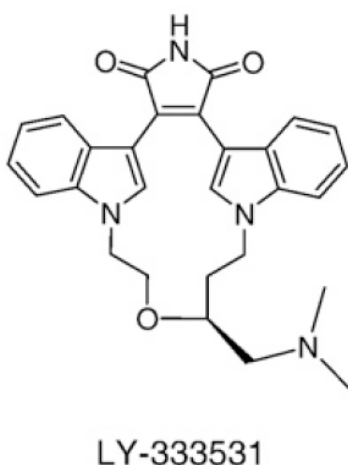


Figure 45: Structure du LY333531.

Adapté de ⁴¹².

Les études ont permis de démontrer que l'inhibition de la voie PKC β par un traitement au LY333531 administré oralement à des rats STZ permettait la normalisation de complications microvasculaires⁴¹³⁻⁴¹⁵, prévenait l'augmentation de l'expression de protéines de la MEC comme la fibronectine et TGF- β ^{406,416} et conduisait à une amélioration de l'hyperalgésie⁴¹⁷. Étant donné les résultats positifs obtenus avec cet inhibiteur, aussi appelé le ruboxistaurin, des études ont été menées afin d'évaluer le potentiel clinique de cette molécule chez les patients diabétiques, notamment pour le traitement des rétinopathies. Une étude de

phase III a démontré une diminution significative des cas de pertes de vision chez les patients diabétiques utilisant le médicament comparativement à ceux utilisant le placebo. Malgré tout, la FDA n'a finalement pas approuvé la molécule dans le cadre d'une demande de drogue nouvelle pour le traitement des rétinopathies émise par Eli Lilly. Il n'est toutefois pas exclu que cette molécule soit étudiée à nouveau pour le traitement de d'autres complications cardiovasculaires associées au diabète, ou encore qu'une molécule différente mais ciblant tout de même la PKC β soit développée. D'ailleurs, de nouvelles entités chimiques ont été mises au point récemment, dont le PF-04577806. Cette dernière est un dérivé pyrrolopyrazole, une structure commune à plusieurs inhibiteurs de protéines kinases mais différente de celle du LY333531⁴¹². Les études faites jusqu'à présent ont démontré que le PF-04577806, lorsqu'administré oralement à des rats STZ, modulait l'activité PKC au niveau de la rétine et renversait l'augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne⁴¹².

5.3.2. Vitamine E

Une autre approche consisterait à diminuer les concentrations de DAG pour ainsi contrer l'activation de la PKC, ce qui est possible grâce à l'administration de D- α -tocophérol (vitamine E). Cet effet a été démontré *in vitro* dans les CMLV aortiques cultivées en milieu HG et *in vivo* dans les aortes de rats STZ, où les concentrations de DAG ont été normalisées en présence de vitamine E⁴¹⁸. Le mécanisme serait attribuable en partie à la capacité de la vitamine E à augmenter l'activité de la DAG kinase, responsable du métabolisme de DAG et qui assure donc sa conversion en acide phosphatidique^{419,420}. L'effet thérapeutique de la vitamine E, administrée oralement à une dose très élevée de 1800 UI/jour, a même été confirmé chez des patients souffrant de T1DM, chez qui la perfusion rétinienne a été améliorée suite au traitement⁴²¹. Par contre, dans le cadre de l'étude HOPE, l'administration de vitamine E à une dose de 400 UI n'a pas permis de prévenir les complications cardiovasculaires auprès d'une population à haut risque⁴²². La différence dans les doses utilisées pourrait expliquer cette discordance.

5.3.3. Ramipril

Une normalisation de l'activité PKC a aussi été observée dans le lit mésentérique de rats STZ traités au ramipril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA)⁴²³. Cette normalisation a été observée autant après 8 semaines qu'après 24 semaines de diabète. Les auteurs de l'étude ont suggéré que cet effet pourrait être responsable de la protection des organes-cibles accordée par le ramipril. Dans l'étude HOPE, l'administration du ramipril a été bénéfique pour les patients diabétiques, chez qui une diminution du taux de complications cardiovasculaires associées au diabète a été observée, et ce, en prenant en considération le fait que plusieurs patients étaient normotendus à l'entrée dans le protocole⁴²⁴. Il a aussi été démontré que le ramipril réduisait la rigidité artérielle indépendamment de la PAM chez des patients atteints de maladie artérielle périphérique, un effet accompagné d'une augmentation du ratio élastine/collagène⁴²⁵. Par contre, l'activité de PKC n'a pas été évaluée. Il est clair que ce sujet mérite une attention particulière et que de nouvelles études seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine des bénéfices accordés par le ramipril.

5.4. Nouvelles avenues de recherche

Afin de poursuivre l'évaluation du potentiel thérapeutique des différentes cibles mentionnées ci-haut, certaines avenues de recherche auraient avantage à être explorées.

Le premier aspect à éclaircir porte sur l'administration de vitamine K chez les rats de notre modèle. En effet, la question de l'impact de la supplémentation en vitamine K sur la calcification n'est pas résolue. Malgré le fait que les résultats de nos études ne semblent pas indiquer que l'administration d'un supplément en vitamine K, alors que les concentrations de celle-ci sont déjà supérieures chez les rats diabétiques, aurait un effet bénéfique sur la

calcification vasculaire, certains mécanismes compensatoires pourraient être mis en jeu et nous réserver des surprises.

Le deuxième aspect qui serait intéressant à confirmer est la relation expression/activité de la γ -carboxylase au niveau aortique. Cette information ajouterait un appui supplémentaire à notre hypothèse que l'altération de cette enzyme en présence de diabète résulte en une diminution de la MGP γ -carboxylée.

Le troisième aspect qui mérite une attention particulière est évidemment la vérification de l'effet des modulateurs de la voie PKC sur l'expression aortique de la γ -carboxylase et la quantité de MGP γ -carboxylée présente dans la paroi vasculaire, et bien sûr sur les complications macrovasculaires observées dans notre modèle. Il s'agit du LY333531, de la vitamine E et du ramipril. L'avantage est que ces molécules sont déjà disponibles pour l'administration par voie orale, permettant une administration facilitée chez le modèle animal. De plus, si des résultats prometteurs sont obtenus avec une molécule déjà biodisponible oralement, c'est un pas de plus de franchi pour une utilisation éventuelle en tant que thérapie chez l'humain.

Finalement, il serait important de poursuivre la caractérisation du modèle *ex vivo* en ce qui a trait à l'expression de la MGP γ -carboxylée. En effet, malgré la diminution de l'expression de la γ -carboxylase, la quantité de MGP γ -carboxylée n'a pas été modifiée dans la fenêtre de temps où elle a été évaluée, soit après 24 heures d'incubation. Une des possibilités pour expliquer ce résultat est qu'il se peut qu'il y ait un décalage entre l'effet de la diminution de l'expression de γ -carboxylase et l'impact sur la γ -carboxylation de la MGP et ainsi, la diminution de la quantité de MGP γ -carboxylée ne s'observerait qu'après 36 ou 48 heures par exemple.

En conclusion, les travaux de cette thèse ont permis de rappeler le risque cardiovasculaire auquel sont exposées les personnes souffrant du T1DM. Plus spécifiquement, nous avons soulevé la problématique entourant l'accélération du développement de la rigidité artérielle, amenée en partie par la calcification vasculaire. Nous avons mis en évidence l'altération de la γ -carboxylase au niveau de l'aorte, le déficit en MGP γ -carboxylée dans la

paroi aortique, et soulevé d'importantes interrogations par rapport à la vitamine K. De plus, l'étude des voies de signalisation impliquées a permis de cibler la voie $PKC\beta$ comme étant la voie possiblement impliquée dans l'altération de la γ -carboxylase, une information qui a mené à la suggestion d'avenues thérapeutiques possibles. Ces résultats, synthétisés à la Figure 46, contribuent à l'avancement des connaissances à ce sujet et proposent de nouvelles pistes de réflexion qui seront je l'espère explorées éventuellement par de nouveaux groupes de recherche.

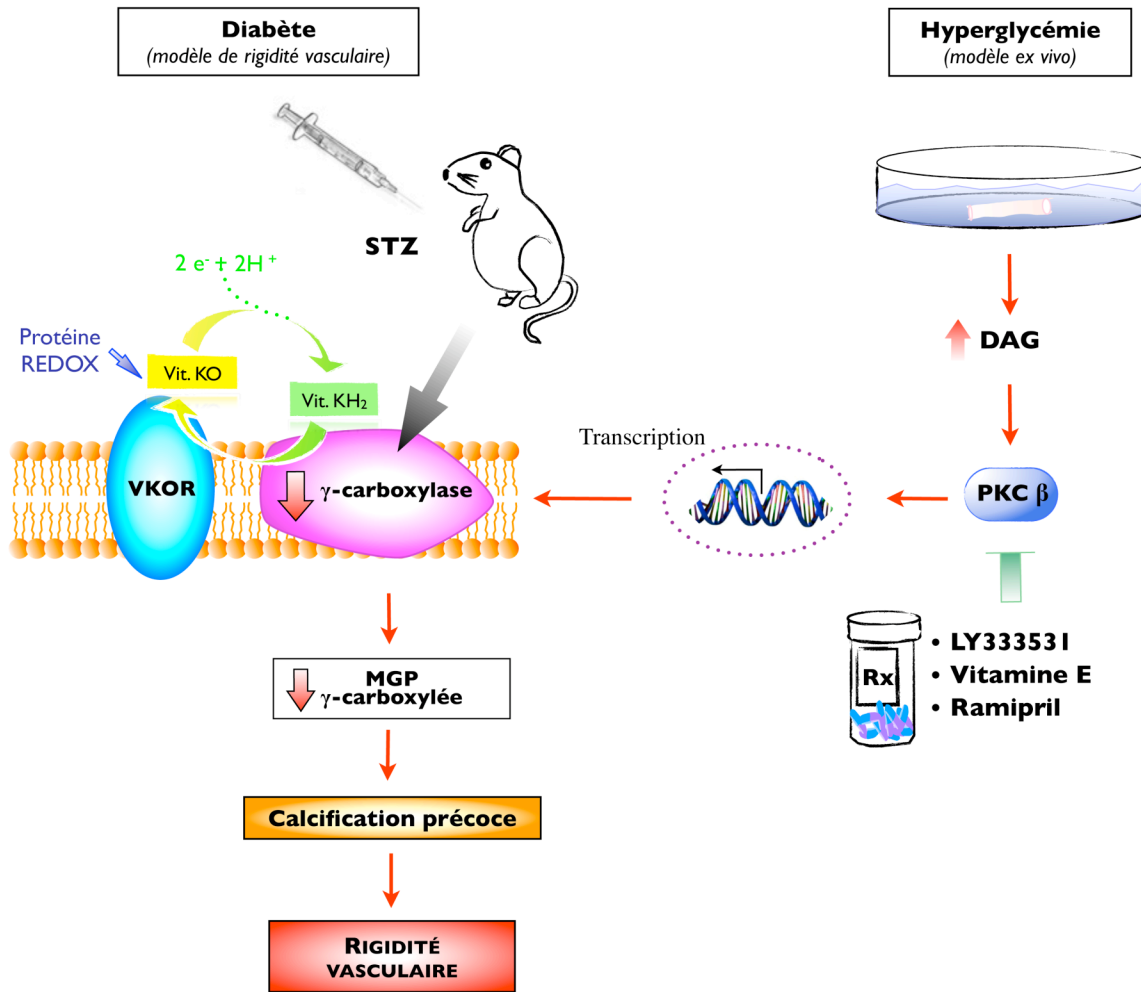


Figure 46: Conceptualisation des résultats

Le diabète ne modifie pas la VKOR, mais entraîne une diminution de l'expression aortique de la γ -carboxylase chez le rat STZ. Il s'en suit une diminution de la quantité de MGP γ -carboxylée dans la paroi vasculaire, contribuant au développement de la calcification vasculaire et ainsi, de la rigidité artérielle. Cette même diminution de l'expression de la γ -carboxylase est reproduite *ex vivo*, par un mécanisme impliquant la voie de signalisation PKC β .

CHAPITRE 6. Bibliographie

1. Bader H. Importance of the gerontology of elastic arteries in the development of essential hypertension. *Clinical physiology and biochemistry* 1983; **1**: 36-56.
2. Belz GG. Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 1995; **9**: 73-83.
3. Frank O. The basic shape of the arterial pulse. First treatise: mathematical analysis. 1899. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1990; **22**: 255-277.
4. Li JK-J. The Arterial Circulation. Physical Principles and Clinical Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2000.
5. London GM, Pannier B. Arterial functions: how to interpret the complex physiology. *Nephrol Dial Transplant* 2010; **25**: 3815-3823.
6. Safar M. Paroi artérielle et vieillissement vasculaire. 2002.
7. Shadwick RE. Mechanical design in arteries. *The Journal of experimental biology* 1999; **202**: 3305-3313.
8. Nichols WN, O'Rourke MF. McDonald's Blood Flow in Arteries. Theoretical, experimental and clinical principles. New York: Oxford University Press Inc., 1998.
9. Armentano RL, Barra JG, Levenson J, Simon A, Pichel RH. Arterial wall mechanics in conscious dogs. Assessment of viscous, inertial, and elastic moduli to characterize aortic wall behavior. *Circulation research* 1995; **76**: 468-478.
10. Armentano RL, Barra JG, Santana DB, Pessana FM, Graf S, Craiem D *et al.* Smart damping modulation of carotid wall energetics in human hypertension: effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension* 2006; **47**: 384-390.
11. Bergel DH. The dynamic elastic properties of the arterial wall. *The Journal of physiology* 1961; **156**: 458-469.
12. Holeček M, Kochová P, Tonar Z. Mechanical Properties of Living Cells and Tissues Related to Thermodynamics, Experiments and Quantitative Morphology – A Review. 2011.
13. O'Rourke MF, Mancia G. Arterial stiffness. *Journal of hypertension* 1999; **17**: 1-4.
14. D'alché EP. Comprendre la physiologie cardiovasculaire. Paris, 2003.
15. Safar ME, O'Rourke MF. Arterial stiffness in hypertension. Amsterdam, 2006.
16. Bia D, Armentano RL, Zocalo Y, Barmak W, Migliaro E, Cabrera Fischer EI. In Vitro Model to Study Arterial Wall Dynamics through Pressure-Diameter Relationship Analysis. *Latin American Applied Research* 2005; **35**: 217-224.
17. Westerhof N, Sipkema P, van den Bos GC, Elzinga G. Forward and backward waves in the arterial system. *Cardiovascular research* 1972; **6**: 648-656.
18. Safar ME, Protogerou AD, Blacher J. Statins, central blood pressure, and blood pressure amplification. *Circulation* 2009; **119**: 9-12.
19. Kot PA, Rose JC. The Aorta. New York: Grune & Stratton, Inc., 1979.
20. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiological reviews* 2009; **89**: 957-989.
21. Roach MR, Burton AC. The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 1957; **35**: 681-690.
22. Greenwald SE. Pulse pressure and arterial elasticity. *Qjm* 2002; **95**: 107-112.
23. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; **288**: 373-376.

24. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research* 2001; **49**: 507-521.
25. Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *British journal of pharmacology* 1986; **88**: 411-415.
26. Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS letters* 1990; **268**: 386-393.
27. Dingemans KP, Teeling P, Lagendijk JH, Becker AE. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. *The Anatomical record* 2000; **258**: 1-14.
28. Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *Faseb J* 1993; **7**: 1208-1218.
29. Burton AC. Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. *Physiological reviews* 1954; **34**: 619-642.
30. Wolinsky H, Glagov S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circulation research* 1967; **20**: 99-111.
31. O'Connell MK, Murthy S, Phan S, Xu C, Buchanan J, Spilker R *et al*. The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. *Matrix Biol* 2008; **27**: 171-181.
32. Brooke BS, Karnik SK, Li DY. Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal. *Trends in cell biology* 2003; **13**: 51-56.
33. Aaron BB, Gosline JM. Optical properties of single elastin fibres indicate random protein conformation. *Nature* 1980; **287**: 865-867.
34. Kelleher CM, McLean SE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and aortic development. *Current topics in developmental biology* 2004; **62**: 153-188.
35. Sherratt MJ. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age (Dordrecht, Netherlands)* 2009; **31**: 305-325.
36. Ross R. The elastic fiber. *J Histochem Cytochem* 1973; **21**: 199-208.
37. Ito S, Ishimaru S, Wilson S. 1997. Effect of coacervated alpha-elastin on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. 44th Annual Meeting of the American College of Angiology, ed., Westminster, Las Vegas.
38. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2003; **57**: 195-202.
39. Greenwald SE, Moore JE, Jr., Rachev A, Kane TP, Meister JJ. Experimental investigation of the distribution of residual strains in the artery wall. *Journal of biomechanical engineering* 1997; **119**: 438-444.
40. Nakamura H. Electron microscopic study of the prenatal development of the thoracic aorta in the rat. *The American journal of anatomy* 1988; **181**: 406-418.
41. Roach MR. The pattern of elastin in the aorta and large arteries of mammals. *Ciba Foundation symposium* 1983; **100**: 37-55.
42. Dubick MA, Rucker RB, Cross CE, Last JA. Elastin metabolism in rodent lung. *Biochimica et biophysica acta* 1981; **672**: 303-306.
43. Berry CL, Sosa-Melgarejo JA, Greenwald SE. The relationship between wall tension, lamellar thickness, and intercellular junctions in the fetal and adult aorta: its relevance to the pathology of dissecting aneurysm. *The Journal of pathology* 1993; **169**: 15-20.

44. Wolinsky H. Comparison of medial growth of human thoracic and abdominal aortas. *Circulation research* 1970; **27**: 531-538.
45. Wolinsky H, Glagov S. Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. Deviation of man from the usual pattern. *Circulation research* 1969; **25**: 677-686.
46. Hungerford JE, Owens GK, Argraves WS, Little CD. Development of the aortic vessel wall as defined by vascular smooth muscle and extracellular matrix markers. *Developmental biology* 1996; **178**: 375-392.
47. Gibbons CA, Shadwick RE. Functional similarities in the mechanical design of the aorta in lower vertebrates and mammals. *Experientia* 1989; **45**: 1083-1088.
48. Jacob M. Matrice extracellulaire et vieillissement vasculaire. *Médecine/Sciences* 2006; **22**: 273-287.
49. Morse DE. The Aorta. New York: Grune & Stratton, Inc., 1979.
50. Rezakhaniha R, Agianniotis A, Schrauwen JT, Griffa A, Sage D, Bouten CV *et al*. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 2011; **11**: 461-473.
51. Cabrera Fischer EI, Bia D, Camus JM, Zocalo Y, de Forteza E, Armentano RL. Adventitia-dependent mechanical properties of brachiocephalic ovine arteries in in vivo and in vitro studies. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2006; **188**: 103-111.
52. Laurent S. Defining vascular aging and cardiovascular risk. *Journal of hypertension* 2012; **30 Suppl**: S3-8.
53. Redheuil A, Yu WC, Wu CO, Mousseaux E, de Cesare A, Yan R *et al*. Reduced ascending aortic strain and distensibility: earliest manifestations of vascular aging in humans. *Hypertension* 2010; **55**: 319-326.
54. Greenwald SE. Ageing of the conduit arteries. *The Journal of pathology* 2007; **211**: 157-172.
55. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D *et al*. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *European heart journal* 2006; **27**: 2588-2605.
56. Antonini-Canterin F, Carerj S, Di Bello V, Di Salvo G, La Carrubba S, Vriz O *et al*. Arterial stiffness and ventricular stiffness: a couple of diseases or a coupling disease? A review from the cardiologist's point of view. *Eur J Echocardiogr* 2009; **10**: 36-43.
57. Boutouyrie P. Rigidité artérielle: quelles techniques et quelle place actuelle dans les méthodes d'évaluation du risque? *Sang Thrombose Vaisseaux* 2007; **19**: 473-478.
58. Cohn JN, Finkelstein S, McVeigh G, Morgan D, LeMay L, Robinson J *et al*. Noninvasive pulse wave analysis for the early detection of vascular disease. *Hypertension* 1995; **26**: 503-508.
59. Liu Z, Brin KP, Yin FC. Estimation of total arterial compliance: an improved method and evaluation of current methods. *The American journal of physiology* 1986; **251**: H588-600.
60. O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension* 2005; **46**: 200-204.

61. Avolio AP, Van Bortel LM, Boutouyrie P, Cockcroft JR, McEniery CM, Protogerou AD *et al.* Role of pulse pressure amplification in arterial hypertension: experts' opinion and review of the data. *Hypertension* 2009; **54**: 375-383.
62. Kannel WB. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *Jama* 1996; **275**: 1571-1576.
63. Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA *et al.* Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990; **335**: 827-838.
64. Safar ME. Systolic blood pressure, pulse pressure and arterial stiffness as cardiovascular risk factors. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2001; **10**: 257-261.
65. Cockcroft JR, Wilkinson IB. Large arterial stiffness: an important therapeutic target. *Journal of human hypertension* 2000; **14**: 533-535.
66. Blacher J, Staessen JA, Girerd X, Gasowski J, Thijs L, Liu L *et al.* Pulse pressure not mean pressure determines cardiovascular risk in older hypertensive patients. *Archives of internal medicine* 2000; **160**: 1085-1089.
67. Benetos A, Safar M, Rudnichi A, Smulyan H, Richard JL, Ducimetieere P *et al.* Pulse pressure: a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population. *Hypertension* 1997; **30**: 1410-1415.
68. Benetos A, Rudnichi A, Safar M, Guize L. Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertension* 1998; **32**: 560-564.
69. Franklin SS, Jacobs MJ, Wong ND, L'Italien GJ, Lapuerta P. Predominance of isolated systolic hypertension among middle-aged and elderly US hypertensives: analysis based on National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. *Hypertension* 2001; **37**: 869-874.
70. Benetos A, Zureik M, Morcet J, Thomas F, Bean K, Safar M *et al.* A decrease in diastolic blood pressure combined with an increase in systolic blood pressure is associated with a higher cardiovascular mortality in men. *Journal of the American College of Cardiology* 2000; **35**: 673-680.
71. Safar ME, Blacher J, Mourad JJ, London G, Frohlich ED. What does STOP-2 tell us about management of hypertension? *Lancet* 2000; **355**: 651-652; author reply 653.
72. Safar ME, Jankowski P. Central blood pressure and hypertension: role in cardiovascular risk assessment. *Clin Sci (Lond)* 2009; **116**: 273-282.
73. Safar ME. Pulse pressure, arterial stiffness, and cardiovascular risk. *Current opinion in cardiology* 2000; **15**: 258-263.
74. Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Thijs L, Ibsen H *et al.* Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation* 2006; **113**: 664-670.
75. Sutton-Tyrrell K, Najjar SS, Boudreau RM, Venkitachalam L, Kupelian V, Simonsick EM *et al.* Elevated aortic pulse wave velocity, a marker of arterial stiffness, predicts cardiovascular events in well-functioning older adults. *Circulation* 2005; **111**: 3384-3390.

76. Collaboration. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'. *European heart journal* 2010; **31**: 2338-2350.
77. O'Rourke MF, Safar ME, Dzau V. The Cardiovascular Continuum extended: aging effects on the aorta and microvasculature. *Vascular medicine (London, England)* 2010; **15**: 461-468.
78. Bateman GA. Pulse-wave encephalopathy: a comparative study of the hydrodynamics of leukoaraiosis and normal-pressure hydrocephalus. *Neuroradiology* 2002; **44**: 740-748.
79. Henry Feugeas MC, De Marco G, Peretti, II, Godon-Hardy S, Fredy D, Claeys ES. Age-related cerebral white matter changes and pulse-wave encephalopathy: observations with three-dimensional MRI. *Magnetic resonance imaging* 2005; **23**: 929-937.
80. Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Hofman A, van Popele NM, Bos ML, Schalekamp MA *et al.* Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* 2006; **113**: 657-663.
81. Gatzka CD, Cameron JD, Kingwell BA, Dart AM. Relation between coronary artery disease, aortic stiffness, and left ventricular structure in a population sample. *Hypertension* 1998; **32**: 575-578.
82. Namasivayam M, Adji A, O'Rourke MF. Influence of aortic pressure wave components determined noninvasively on myocardial oxygen demand in men and women. *Hypertension* 2011; **57**: 193-200.
83. Kingwell BA, Waddell TK, Medley TL, Cameron JD, Dart AM. Large artery stiffness predicts ischemic threshold in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; **40**: 773-779.
84. Guelen I, Mattace-Raso FU, van Popele NM, Westerhof BE, Hofman A, Witteman JC *et al.* Aortic stiffness and the balance between cardiac oxygen supply and demand: the Rotterdam Study. *Journal of hypertension* 2008; **26**: 1237-1243.
85. Kass DA, Saeki A, Tunin RS, Recchia FA. Adverse influence of systemic vascular stiffening on cardiac dysfunction and adaptation to acute coronary occlusion. *Circulation* 1996; **93**: 1533-1541.
86. Ferro G, Duilio C, Spinelli L, Liucci GA, Mazza F, Indolfi C. Relation between diastolic perfusion time and coronary artery stenosis during stress-induced myocardial ischemia. *Circulation* 1995; **92**: 342-347.
87. Spina M, Garbisa S, Hinnie J, Hunter JC, Serafini-Fracassini A. Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 1983; **3**: 64-76.
88. Boutouyrie P, Laurent S, Benetos A, Girerd XJ, Hoeks AP, Safar ME. Opposing effects of ageing on distal and proximal large arteries in hypertensives. *J Hypertens Suppl* 1992; **10**: S87-91.
89. Benetos A, Laurent S, Hoeks AP, Boutouyrie PH, Safar ME. Arterial alterations with aging and high blood pressure. A noninvasive study of carotid and femoral arteries. *Arterioscler Thromb* 1993; **13**: 90-97.
90. Virmani R, Avolio AP, Mergner WJ, Robinowitz M, Herderick EE, Cornhill JF *et al.* Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of

- hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *The American journal of pathology* 1991; **139**: 1119-1129.
91. Gudiene D, Valanciute A, Velavicius J. Collagen network changes in basilar artery in aging. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 2007; **43**: 964-970.
 92. Jani B, Rajkumar C. Ageing and vascular ageing. *Postgraduate medical journal* 2006; **82**: 357-362.
 93. Wang M, Zhang J, Jiang LQ, Spinetti G, Pintus G, Monticone R *et al.* Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall. *Hypertension* 2007; **50**: 219-227.
 94. Stakos DA, Tziakas DN, Chalikias GK, Mitrousi K, Tsigalou C, Boudoulas H. Associations between collagen synthesis and degradation and aortic function in arterial hypertension. *American journal of hypertension* 2010; **23**: 488-494.
 95. Watanabe M, Sawai T, Nagura H, Suyama K. Age-related alteration of cross-linking amino acids of elastin in human aorta. *The Tohoku journal of experimental medicine* 1996; **180**: 115-130.
 96. Marque V, Kieffer P, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Elastic properties and composition of the aortic wall in old spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999; **34**: 415-422.
 97. Sawabe M. Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance. *Geriatrics & gerontology international* 2010; **10 Suppl 1**: S213-220.
 98. Sivan SS, Wachtel E, Tsitron E, Sakkee N, van der Ham F, Degroot J *et al.* Collagen turnover in normal and degenerate human intervertebral discs as determined by the racemization of aspartic acid. *The Journal of biological chemistry* 2008; **283**: 8796-8801.
 99. Barnes MJ, Farndale RW. Collagens and atherosclerosis. *Experimental gerontology* 1999; **34**: 513-525.
 100. Michel JB, Heudes D, Michel O, Poitevin P, Philippe M, Scalbert E *et al.* Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries. *The American journal of physiology* 1994; **267**: R124-135.
 101. Cattell MA, Anderson JC, Hasleton PS. Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1996; **245**: 73-84.
 102. Anderson JB, Barnett E, Nordin BE. The Relation between Osteoporosis and Aortic Calcification. *The British journal of radiology* 1964; **37**: 910-912.
 103. Hosoda Y, Kawano K, Yamasawa F, Ishii T, Shibata T, Inayama S. Age-dependent changes of collagen and elastin content in human aorta and pulmonary artery. *Angiology* 1984; **35**: 615-621.
 104. Maurel E, Shuttleworth CA, Bouissou H. Interstitial collagens and ageing in human aorta. *Virchows Archiv* 1987; **410**: 383-390.
 105. Cox RH. Basis for the altered arterial wall mechanics in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1981; **3**: 485-495.
 106. Zhang M, Pierce RA, Wachi H, Mecham RP, Parks WC. An open reading frame element mediates posttranscriptional regulation of tropoelastin and responsiveness to transforming growth factor beta1. *Molecular and cellular biology* 1999; **19**: 7314-7326.

107. Davis EC. Elastic lamina growth in the developing mouse aorta. *J Histochem Cytochem* 1995; **43**: 1115-1123.
108. Powell JT, Vine N, Crossman M. On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta. *Atherosclerosis* 1992; **97**: 201-208.
109. Elliott RJ, McGrath LT. Calcification of the human thoracic aorta during aging. *Calcified tissue international* 1994; **54**: 268-273.
110. Li Z, Froehlich J, Galis ZS, Lakatta EG. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension* 1999; **33**: 116-123.
111. Robert L, Robert AM, Fulop T. Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin? *Biogerontology* 2008; **9**: 119-133.
112. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 2008; **117**: 2938-2948.
113. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 2959-2964.
114. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circulation research* 2005; **97**: 105-114.
115. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *American journal of physiology* 2004; **286**: E686-696.
116. Shanahan CM. Vascular calcification--a matter of damage limitation? *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 1166-1169.
117. Amann K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; **3**: 1599-1605.
118. Speer MY, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol* 2004; **13**: 63-70.
119. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circulation research* 2006; **99**: 1044-1059.
120. Monckeberg J. Uber die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Arch Pathol Anat* 1903; **171**: 141-167.
121. Valdivielso JM. Vascular calcification: types and mechanisms. *Nefrologia* 2011; **31**: 142-147.
122. Schoppet M, Al-Fakhri N, Franke FE, Katz N, Barth PJ, Maisch B *et al*. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004; **89**: 4104-4112.
123. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nature reviews* 2010; **7**: 528-536.
124. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003; **23**: 489-494.
125. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004; **24**: 1161-1170.

126. Shao JS, Cheng SL, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertension* 2010; **55**: 579-592.
127. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber D, Virmani R. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation* 2002; **105**: 297-303.
128. Stary HC. Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression. *Zeitschrift fur Kardiologie* 2000; **89 Suppl 2**: 28-35.
129. Iyemere VP, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *Journal of internal medicine* 2006; **260**: 192-210.
130. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH *et al.* Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* 2007; **116**: 2841-2850.
131. Blumenthal HT, Lansing AI, Wheeler PA. Calcification of the Media of the Human Aorta and Its Relation to Intimal Arteriosclerosis, Ageing and Disease. *The American journal of pathology* 1944; **20**: 665-687.
132. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999; **100**: 2168-2176.
133. Towler DA. Vascular Calcification: A Perspective On An Imminent Disease Epidemic. *IBMS BoneKEy* 2008; **5**: 41-58.
134. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circulation research* 2000; **87**: 1055-1062.
135. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 1983; **172**: 173-177.
136. Price PA, Faus SA, 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**: 817-824.
137. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. SB 242784, a selective inhibitor of the osteoclastic V-H+ATPase, inhibits arterial calcification in the rat. *Circulation research* 2002; **91**: 547-552.
138. Price PA, Buckley JR, Williamson MK. The amino bisphosphonate ibandronate prevents vitamin D toxicity and inhibits vitamin D-induced calcification of arteries, cartilage, lungs and kidneys in rats. *The Journal of nutrition* 2001; **131**: 2910-2915.
139. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; **89**: 309-319.
140. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics* 2008; **473**: 139-146.
141. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2002; **22**: 549-553.

142. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circulation research* 2004; **95**: 1046-1057.
143. Van Campenhout A, Golledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009; **204**: 321-329.
144. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in molecular medicine* 2006; **12**: 17-25.
145. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C *et al.* osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & development* 1998; **12**: 1260-1268.
146. Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcified tissue international* 2004; **74**: 103-106.
147. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *The Journal of clinical investigation* 1993; **91**: 1800-1809.
148. Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL *et al.* Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circulation research* 2009; **104**: 733-741.
149. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R *et al.* Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circulation research* 2001; **89**: 1147-1154.
150. Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney international* 2004; **66**: 2293-2299.
151. Tilton RG. Capillary pericytes: perspectives and future trends. *Journal of electron microscopy technique* 1991; **19**: 327-344.
152. King KE, Iyemere VP, Weissberg PL, Shanahan CM. Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *The Journal of biological chemistry* 2003; **278**: 11661-11669.
153. Shao JS, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006; **26**: 1423-1430.
154. Cheng SL, Shao JS, Halstead LR, Distelhorst K, Sierra O, Towler DA. Activation of vascular smooth muscle parathyroid hormone receptor inhibits Wnt/beta-catenin signaling and aortic fibrosis in diabetic arteriosclerosis. *Circulation research* 2010; **107**: 271-282.
155. Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *The Journal of biological chemistry* 2003; **278**: 45969-45977.
156. Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 2003; **18**: 1842-1853.

157. Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *The Journal of clinical investigation* 2005; **115**: 1210-1220.
158. Bujan J, Bellon JM, Sabater C, Jurado F, Garcia-Honduvilla N, Dominguez B *et al.* Modifications induced by atherogenic diet in the capacity of the arterial wall in rats to respond to surgical insult. *Atherosclerosis* 1996; **122**: 141-152.
159. Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. *The American journal of pathology* 1983; **113**: 143-155.
160. Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation* 1993; **92**: 1686-1696.
161. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D *et al.* Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 2857-2867.
162. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney international* 2002; **62**: 1724-1731.
163. Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation research* 2006; **98**: 905-912.
164. Lee D. Vascular calcification: Inducers and inhibitors. *Materials Science and Engineering B* 2011; **176**: 1133-1141.
165. Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 1998; **98**: 1302-1306.
166. Drueke TB, Massy ZA. Role of vitamin D in vascular calcification: bad guy or good guy? *Nephrol Dial Transplant* 2012; **27**: 1704-1707.
167. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Vitamin D and vascular calcification. *Current opinion in lipidology* 2007; **18**: 41-46.
168. Schurgers LJ, Aebert H, Vermeer C, Bultmann B, Janzen J. Oral anticoagulant treatment: friend or foe in cardiovascular disease? *Blood* 2004; **104**: 3231-3232.
169. Koos R, Mahnken AH, Muhlenbruch G, Brandenburg V, Pflueger B, Wildberger JE *et al.* Relation of oral anticoagulation to cardiac valvular and coronary calcium assessed by multislice spiral computed tomography. *The American journal of cardiology* 2005; **96**: 747-749.
170. Kirton JP, Wilkinson FL, Canfield AE, Alexander MY. Dexamethasone downregulates calcification-inhibitor molecules and accelerates osteogenic differentiation of vascular pericytes: implications for vascular calcification. *Circulation research* 2006; **98**: 1264-1272.

171. Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL. Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circulation research* 2001; **88**: 954-960.
172. Rezg R, Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Druke TB, Massy ZA. Inhibitors of vascular calcification as potential therapeutic targets. *Journal of nephrology* 2011; **24**: 416-427.
173. Price PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochemical and biophysical research communications* 1983; **117**: 765-771.
174. Price PA, Williamson MK. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *The Journal of biological chemistry* 1985; **260**: 14971-14975.
175. Hackeng TM, Rosing J, Spronk HM, Vermeer C. Total chemical synthesis of human matrix Gla protein. *Protein Sci* 2001; **10**: 864-870.
176. Fraser JD, Price PA. Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the gamma-carboxylase. *The Journal of biological chemistry* 1988; **263**: 11033-11036.
177. Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thrombosis and haemostasis* 1999; **82**: 1764-1767.
178. Zhao J, Nishimoto SK. Matrix Gla protein gene expression is elevated during postnatal development. *Matrix Biol* 1996; **15**: 131-140.
179. Presnell SR, Stafford DW. The vitamin K-dependent carboxylase. *Thrombosis and haemostasis* 2002; **87**: 937-946.
180. Zhu A, Sun H, Raymond RM, Jr., Furie BC, Furie B, Bronstein M *et al.* Fatal hemorrhage in mice lacking gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* 2007; **109**: 5270-5275.
181. Rishavy MA, Usabalieva A, Hallgren KW, Berkner KL. Novel insight into the mechanism of the vitamin K oxidoreductase (VKOR): electron relay through Cys43 and Cys51 reduces VKOR to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation. *The Journal of biological chemistry* 2011; **286**: 7267-7278.
182. Dam H. The antihemorrhagic vitamin of the chick. *The Biochemical journal* 1935; **29**: 1273-1285.
183. Nelsestuen GL. Role of gamma-carboxyglutamic acid. An unusual protein transition required for the calcium-dependent binding of prothrombin to phospholipid. *The Journal of biological chemistry* 1976; **251**: 5648-5656.
184. Wallin R, Martin LF. Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. Effects of warfarin. *The Journal of clinical investigation* 1985; **76**: 1879-1884.
185. Schurgers LJ, Spronk HM, Soute BA, Schiffrers PM, DeMey JG, Vermeer C. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood* 2007; **109**: 2823-2831.

186. Friedman PA, Shia MA, Gallop PM, Griep AE. Vitamin K-dependent gamma-carbon-hydrogen bond cleavage and nonmandatory concurrent carboxylation of peptide-bound glutamic acid residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979; **76**: 3126-3129.
187. Bandyopadhyay PK. Vitamin K-dependent gamma-glutamylcarboxylation: an ancient posttranslational modification. *Vitamins and hormones* 2008; **78**: 157-184.
188. Wajih N, Borrás T, Xue W, Hutson SM, Wallin R. Processing and transport of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein and bone morphogenetic protein-2 in cultured human vascular smooth muscle cells: evidence for an uptake mechanism for serum fetuin. *The Journal of biological chemistry* 2004; **279**: 43052-43060.
189. Esmon CT, Sadowski JA, Suttie JW. A new carboxylation reaction. The vitamin K-dependent incorporation of H-14-CO₃- into prothrombin. *The Journal of biological chemistry* 1975; **250**: 4744-4748.
190. Van Haarlem LJ, Ulrich MM, Hemker HC, Soute BA, Vermeer C. Isolation and partial characterization of a vitamin K-dependent carboxylase from bovine aortae. *The Biochemical journal* 1987; **245**: 251-255.
191. Wu SM, Morris DP, Stafford DW. Identification and purification to near homogeneity of the vitamin K-dependent carboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; **88**: 2236-2240.
192. Vermeer C. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *The Biochemical journal* 1990; **266**: 625-636.
193. Tie J, Wu SM, Jin D, Nichitta CV, Stafford DW. A topological study of the human gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* 2000; **96**: 973-978.
194. Rishavy MA, Pudota BN, Hallgren KW, Qian W, Yakubenko AV, Song JH *et al.* A new model for vitamin K-dependent carboxylation: the catalytic base that deprotonates vitamin K hydroquinone is not Cys but an activated amine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; **101**: 13732-13737.
195. Vermeer C. Vitamin K: the effect on health beyond coagulation - an overview. *Food & nutrition research* 2012; **56**.
196. Sugiura I, Furie B, Walsh CT, Furie BC. Propeptide and glutamate-containing substrates bound to the vitamin K-dependent carboxylase convert its vitamin K epoxidase function from an inactive to an active state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; **94**: 9069-9074.
197. Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 1999; **93**: 1798-1808.
198. Berkner KL. The vitamin K-dependent carboxylase. *The Journal of nutrition* 2000; **130**: 1877-1880.
199. Shimizu A, Sugiura I, Matsushita T, Kojima T, Hirai M, Saito H. Identification of the five hydrophilic residues (Lys-217, Lys-218, Arg-359, His-360, and Arg-513) essential for the structure and activity of vitamin K-dependent carboxylase. *Biochemical and biophysical research communications* 1998; **251**: 22-26.
200. Mutucumarana VP, Acher F, Straight DL, Jin DY, Stafford DW. A conserved region of human vitamin K-dependent carboxylase between residues 393 and 404 is important

- for its interaction with the glutamate substrate. *The Journal of biological chemistry* 2003; **278**: 46488-46493.
201. Carlisle TL, Suttie JW. Vitamin K dependent carboxylase: subcellular location of the carboxylase and enzymes involved in vitamin K metabolism in rat liver. *Biochemistry* 1980; **19**: 1161-1167.
 202. Bristol JA, Ratcliffe JV, Roth DA, Jacobs MA, Furie BC, Furie B. Biosynthesis of prothrombin: intracellular localization of the vitamin K-dependent carboxylase and the sites of gamma-carboxylation. *Blood* 1996; **88**: 2585-2593.
 203. Pan LC, Price PA. The propeptide of rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin K-dependent protein precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985; **82**: 6109-6113.
 204. Price PA, Fraser JD, Metz-Virca G. Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987; **84**: 8335-8339.
 205. Berkner KL, Runge KW. The physiology of vitamin K nutrition and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2004; **2**: 2118-2132.
 206. Knobloch JE, Suttie JW. Vitamin K-dependent carboxylase. Control of enzyme activity by the "propeptide" region of factor X. *The Journal of biological chemistry* 1987; **262**: 15334-15337.
 207. Morris DP, Stevens RD, Wright DJ, Stafford DW. Processive post-translational modification. Vitamin K-dependent carboxylation of a peptide substrate. *The Journal of biological chemistry* 1995; **270**: 30491-30498.
 208. Vanakker OM, Martin L, Gheduzzi D, Leroy BP, Loeys BL, Guerci VI *et al.* Pseudoxanthoma elasticum-like phenotype with cutis laxa and multiple coagulation factor deficiency represents a separate genetic entity. *The Journal of investigative dermatology* 2007; **127**: 581-587.
 209. de Boer-van den Berg MAG, Van Haarlem LJ, Vermeer C. Vitamin K-Dependent Carboxylase in Human Vessel Wall. *Thrombosis research* 1986; **Suppl. VI**: 134.
 210. Wang T, Yang J, Qiao J, Liu J, Guo X, Ye Z. Activity and expression of vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase in patients with calcium oxalate urolithiasis. *Urologia internationalis* 2010; **85**: 94-99.
 211. Chen J, Liu J, Zhang Y, Ye Z, Wang S. Decreased renal vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase activity in calcium oxalate calculi patients. *Chinese medical journal* 2003; **116**: 569-572.
 212. Crosier MD, Peter I, Booth SL, Bennett G, Dawson-Hughes B, Ordovas JM. Association of sequence variations in vitamin K epoxide reductase and gamma-glutamyl carboxylase genes with biochemical measures of vitamin K status. *Journal of nutritional science and vitaminology* 2009; **55**: 112-119.
 213. Binkley NC, Krueger DC, Engelke JA, Foley AL, Suttie JW. Vitamin K supplementation reduces serum concentrations of under-gamma-carboxylated osteocalcin in healthy young and elderly adults. *The American journal of clinical nutrition* 2000; **72**: 1523-1528.

214. Stanley TB, Jin DY, Lin PJ, Stafford DW. The propeptides of the vitamin K-dependent proteins possess different affinities for the vitamin K-dependent carboxylase. *The Journal of biological chemistry* 1999; **274**: 16940-16944.
215. Engelke JA, Hale JE, Suttie JW, Price PA. Vitamin K-dependent carboxylase: utilization of decarboxylated bone Gla protein and matrix Gla protein as substrates. *Biochimica et biophysica acta* 1991; **1078**: 31-34.
216. Tokunaga F, Wakabayashi S, Koide T. Warfarin causes the degradation of protein C precursor in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 1995; **34**: 1163-1170.
217. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ *et al.* Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; **427**: 537-541.
218. Wang Y, Zhen Y, Shi Y, Chen J, Zhang C, Wang X *et al.* Vitamin k epoxide reductase: a protein involved in angiogenesis. *Mol Cancer Res* 2005; **3**: 317-323.
219. Bell RG, Matschiner JT. Vitamin K activity of phylloquinone oxide. *Archives of biochemistry and biophysics* 1970; **141**: 473-476.
220. Fasco MJ, Hildebrandt EF, Suttie JW. Evidence that warfarin anticoagulant action involves two distinct reductase activities. *The Journal of biological chemistry* 1982; **257**: 11210-11212.
221. Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 2004; **427**: 541-544.
222. Chu PH, Huang TY, Williams J, Stafford DW. Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; **103**: 19308-19313.
223. Tie JK, Nicchitta C, von Heijne G, Stafford DW. Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/cotranslocation. *The Journal of biological chemistry* 2005; **280**: 16410-16416.
224. Wallin R, Sane DC, Hutson SM. Vitamin K 2,3-epoxide reductase and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Thrombosis research* 2002; **108**: 221-226.
225. Wajih N, Hutson SM, Wallin R. Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *The Journal of biological chemistry* 2007; **282**: 2626-2635.
226. Schulman S, Wang B, Li W, Rapoport TA. Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; **107**: 15027-15032.
227. Jin DY, Tie JK, Stafford DW. The conversion of vitamin K epoxide to vitamin K quinone and vitamin K quinone to vitamin K hydroquinone uses the same active site cysteines. *Biochemistry* 2007; **46**: 7279-7283.
228. Fasco MJ, Principe LM, Walsh WA, Friedman PA. Warfarin inhibition of vitamin K 2,3-epoxide reductase in rat liver microsomes. *Biochemistry* 1983; **22**: 5655-5660.
229. Fasco MJ, Principe LM. R- and S-Warfarin inhibition of vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide reductase activities in the rat. *The Journal of biological chemistry* 1982; **257**: 4894-4901.

230. Vermeer C, Soute BA, Aalten M, Knapen MH, Thijssen HH. Vitamin K reductases in normal and in warfarin-resistant rats. *Biochemical pharmacology* 1988; **37**: 2876-2878.
231. Pelz HJ, Rost S, Hunerberg M, Fregin A, Heiberg AC, Baert K *et al.* The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 2005; **170**: 1839-1847.
232. Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *The Journal of biological chemistry* 2004; **279**: 25276-25283.
233. Wallin R, Hutson SM, Cain D, Sweatt A, Sane DC. A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *Faseb J* 2001; **15**: 2542-2544.
234. Vecsler M, Loebstein R, Almog S, Kurnik D, Goldman B, Halkin H *et al.* Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. *Thrombosis and haemostasis* 2006; **95**: 205-211.
235. Voora D, Koboldt DC, King CR, Lenzini PA, Eby CS, Porche-Sorbet R *et al.* A polymorphism in the VKORC1 regulator calumenin predicts higher warfarin dose requirements in African Americans. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2010; **87**: 445-451.
236. Loebstein R, Vecsler M, Kurnik D, Austerweil N, Gak E, Halkin H *et al.* Common genetic variants of microsomal epoxide hydrolase affect warfarin dose requirements beyond the effect of cytochrome P450 2C9. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2005; **77**: 365-372.
237. Wadelius M, Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. *The pharmacogenomics journal* 2007; **7**: 99-111.
238. Li T, Lange LA, Li X, Susswein L, Bryant B, Malone R *et al.* Polymorphisms in the VKORC1 gene are strongly associated with warfarin dosage requirements in patients receiving anticoagulation. *Journal of medical genetics* 2006; **43**: 740-744.
239. Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, Eriksson N, Crawford DC, Lee MT *et al.* Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. *Blood* 2010; **115**: 3827-3834.
240. Wang Y, Zhang W, Zhang Y, Yang Y, Sun L, Hu S *et al.* VKORC1 haplotypes are associated with arterial vascular diseases (stroke, coronary heart disease, and aortic dissection). *Circulation* 2006; **113**: 1615-1621.
241. Kohn MH, Price RE, Pelz HJ. A cardiovascular phenotype in warfarin-resistant *Vkorc1* mutant rats. *Artery research* 2008; **2**: 138-147.
242. Roy ME, Nishimoto SK. Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone* 2002; **31**: 296-302.
243. Proudfoot D, Shanahan CM. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology (Carlton, Vic)* 2006; **11**: 455-461.
244. Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM. Matrix gla protein is regulated by a mechanism functionally related to the calcium-sensing receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 2000; **277**: 736-740.
245. Price PA, Thomas GR, Pardini AW, Figueira WF, Caputo JM, Williamson MK. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and

- matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *The Journal of biological chemistry* 2002; **277**: 3926-3934.
246. Bostrom K, Tsao D, Shen S, Wang Y, Demer LL. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *The Journal of biological chemistry* 2001; **276**: 14044-14052.
 247. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *The Journal of biological chemistry* 2002; **277**: 4388-4394.
 248. Wallin R, Cain D, Hutson SM, Sane DC, Loeser R. Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thrombosis and haemostasis* 2000; **84**: 1039-1044.
 249. Sweatt A, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 178-185.
 250. Nishimoto SK, Nishimoto M. Matrix Gla protein C-terminal region binds to vitronectin. Co-localization suggests binding occurs during tissue development. *Matrix Biol* 2005; **24**: 353-361.
 251. Schurgers LJ, Cranenburg EC, Vermeer C. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thrombosis and haemostasis* 2008; **100**: 593-603.
 252. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A *et al*. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005; **25**: 1629-1633.
 253. Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1998; **18**: 379-388.
 254. Jia G, Stormont RM, Gangahar DM, Agrawal DK. Role of matrix Gla protein in angiotensin II-induced exacerbation of vascular calcification. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; **303**: H523-532.
 255. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR *et al*. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; **386**: 78-81.
 256. Meier M, Weng LP, Alexandrakis E, Ruschoff J, Goeckenjan G. Tracheobronchial stenosis in Keutel syndrome. *Eur Respir J* 2001; **17**: 566-569.
 257. Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP, Van Maldergem L, Ziereisen F, Yuksel B *et al*. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nature genetics* 1999; **21**: 142-144.
 258. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1998; **18**: 1400-1407.
 259. Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *The Journal of cell biology* 2004; **165**: 625-630.
 260. O'Donnell CJ, Shea MK, Price PA, Gagnon DR, Wilson PW, Larson MG *et al*. Matrix Gla protein is associated with risk factors for atherosclerosis but not with coronary

- artery calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006; **26**: 2769-2774.
261. Braam LA, Dissel P, Gijsbers BL, Spronk HM, Hamulyak K, Soute BA *et al.* Assay for human matrix gla protein in serum: potential applications in the cardiovascular field. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000; **20**: 1257-1261.
262. Jono S, Ikari Y, Vermeer C, Dissel P, Hasegawa K, Shioi A *et al.* Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thrombosis and haemostasis* 2004; **91**: 790-794.
263. Cranenburg EC, Vermeer C, Koos R, Boumans ML, Hackeng TM, Bouwman FG *et al.* The circulating inactive form of matrix Gla Protein (ucMGP) as a biomarker for cardiovascular calcification. *Journal of vascular research* 2008; **45**: 427-436.
264. Hermans MM, Vermeer C, Kooman JP, Brandenburg V, Ketteler M, Gladziwa U *et al.* Undercarboxylated matrix GLA protein levels are decreased in dialysis patients and related to parameters of calcium-phosphate metabolism and aortic augmentation index. *Blood purification* 2007; **25**: 395-401.
265. Shearer MJ. Vitamin K. *Lancet* 1995; **345**: 229-234.
266. Shearer MJ, Newman P. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thrombosis and haemostasis* 2008; **100**: 530-547.
267. Suttie JW. The importance of menaquinones in human nutrition. *Annual review of nutrition* 1995; **15**: 399-417.
268. Ronden JE, Driittij-Reijnders MJ, Vermeer C, Thijssen HH. Intestinal flora is not an intermediate in the phylloquinone-menaquinone-4 conversion in the rat. *Biochimica et biophysica acta* 1998; **1379**: 69-75.
269. Thijssen HH, Driittij-Reijnders MJ. Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. *The British journal of nutrition* 1994; **72**: 415-425.
270. Davidson RT, Foley AL, Engelke JA, Suttie JW. Conversion of dietary phylloquinone to tissue menaquinone-4 in rats is not dependent on gut bacteria. *The Journal of nutrition* 1998; **128**: 220-223.
271. Taggart WV, Matschiner JT. Metabolism of menadione-6,7-3H in the rat. *Biochemistry* 1969; **8**: 1141-1146.
272. Krueger T, Westenfeld R, Ketteler M, Schurgers LJ, Floege J. Vitamin K deficiency in CKD patients: a modifiable risk factor for vascular calcification? *Kidney international* 2009; **76**: 18-22.
273. Thijssen HH, Driittij-Reijnders MJ, Fischer MA. Phylloquinone and menaquinone-4 distribution in rats: synthesis rather than uptake determines menaquinone-4 organ concentrations. *The Journal of nutrition* 1996; **126**: 537-543.
274. Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ, Thijssen HH, De Mey JG, Vermeer C. Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats. *Journal of vascular research* 2003; **40**: 531-537.
275. Huber AM, Davidson KW, O'Brien-Morse ME, Sadowski JA. Tissue phylloquinone and menaquinones in rats are affected by age and gender. *The Journal of nutrition* 1999; **129**: 1039-1044.

276. Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, Schurgers LJ, Knapen MH, van der Meer IM *et al.* Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *The Journal of nutrition* 2004; **134**: 3100-3105.
277. Gast GC, de Roos NM, Sluijs I, Bots ML, Beulens JW, Geleijnse JM *et al.* A high menaquinone intake reduces the incidence of coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; **19**: 504-510.
278. Shea MK, O'Donnell CJ, Hoffmann U, Dallal GE, Dawson-Hughes B, Ordovas JM *et al.* Vitamin K supplementation and progression of coronary artery calcium in older men and women. *The American journal of clinical nutrition* 2009; **89**: 1799-1807.
279. Braam LA, Hoeks AP, Brouns F, Hamulyak K, Gerichhausen MJ, Vermeer C. Beneficial effects of vitamins D and K on the elastic properties of the vessel wall in postmenopausal women: a follow-up study. *Thrombosis and haemostasis* 2004; **91**: 373-380.
280. Schurgers LJ, Spronk HM, Skepper JN, Hackeng TM, Shanahan CM, Vermeer C *et al.* Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function: importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Thromb Haemost* 2007; **5**: 2503-2511.
281. Saito E, Wachi H, Sato F, Sugitani H, Seyama Y. Treatment with vitamin k(2) combined with bisphosphonates synergistically inhibits calcification in cultured smooth muscle cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2007; **14**: 317-324.
282. Wallin R, Schurgers L, Wajih N. Effects of the blood coagulation vitamin K as an inhibitor of arterial calcification. *Thrombosis research* 2008; **122**: 411-417.
283. Farzaneh-Far A, Weissberg PL, Proudfoot D, Shanahan CM. Transcriptional regulation of matrix gla protein. *Zeitschrift fur Kardiologie* 2001; **90 Suppl 3**: 38-42.
284. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000; **20**: 317-327.
285. Miyake N, Hoshi K, Sano Y, Kikuchi K, Tadano K, Koshihara Y. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 promotes vitamin K2 metabolism in human osteoblasts. *Osteoporos Int* 2001; **12**: 680-687.
286. Karl PI, Carnes DL, Friedman PA. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol administration on the rat renal vitamin K-dependent carboxylating system. *FEBS letters* 1985; **192**: 243-246.
287. Lampropoulos CE, Papaioannou I, D'Cruz DP. Osteoporosis--a risk factor for cardiovascular disease? *Nat Rev Rheumatol* 2010; **8**: 587-598.
288. Sumino H, Ichikawa S, Kasama S, Takahashi T, Kumakura H, Takayama Y *et al.* Elevated arterial stiffness in postmenopausal women with osteoporosis. *Maturitas* 2006; **55**: 212-218.
289. Hak AE, Pols HA, van Hemert AM, Hofman A, Witteman JC. Progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause: a population-based longitudinal study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000; **20**: 1926-1931.
290. Hauschka PV, Carr SA. Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* 1982; **21**: 2538-2547.

291. Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Molecular and cellular biology* 1995; **15**: 1858-1869.
292. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological reviews* 1989; **69**: 990-1047.
293. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C *et al.* Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; **382**: 448-452.
294. Eastell R, Delmas PD, Hodgson SF, Eriksen EF, Mann KG, Riggs BL. Bone formation rate in older normal women: concurrent assessment with bone histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical markers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1988; **67**: 741-748.
295. Nimptsch K, Nieters A, Hailer S, Wolfram G, Linseisen J. The association between dietary vitamin K intake and serum undercarboxylated osteocalcin is modulated by vitamin K epoxide reductase genotype. *The British journal of nutrition* 2009; **101**: 1812-1820.
296. Sokoll LJ, Sadowski JA. Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *The American journal of clinical nutrition* 1996; **63**: 566-573.
297. Sokoll LJ, Booth SL, O'Brien ME, Davidson KW, Tsaioun KI, Sadowski JA. Changes in serum osteocalcin, plasma phylloquinone, and urinary gamma-carboxyglutamic acid in response to altered intakes of dietary phylloquinone in human subjects. *The American journal of clinical nutrition* 1997; **65**: 779-784.
298. van Summeren MJ, van Coeverden SC, Schurgers LJ, Braam LA, Noirt F, Uiterwaal CS *et al.* Vitamin K status is associated with childhood bone mineral content. *The British journal of nutrition* 2008; **100**: 852-858.
299. Yamauchi M, Yamaguchi T, Nawata K, Takaoka S, Sugimoto T. Relationships between undercarboxylated osteocalcin and vitamin K intakes, bone turnover, and bone mineral density in healthy women. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 2010; **29**: 761-765.
300. Rennenberg RJ, de Leeuw PW, Kessels AG, Schurgers LJ, Vermeer C, van Engelshoven JM *et al.* Calcium scores and matrix Gla protein levels: association with vitamin K status. *European journal of clinical investigation* 2010; **40**: 344-349.
301. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic proceedings* 2008; **83**: 1032-1045.
302. Francis MD, Russell RG, Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science (New York, NY)* 1969; **165**: 1264-1266.
303. Nitta K, Akiba T, Suzuki K, Uchida K, Watanabe R, Majima K *et al.* Effects of cyclic intermittent etidronate therapy on coronary artery calcification in patients receiving long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2004; **44**: 680-688.
304. Toussaint ND, Lau KK, Strauss BJ, Polkinghorne KR, Kerr PG. Effect of alendronate on vascular calcification in CKD stages 3 and 4: a pilot randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 2010; **56**: 57-68.
305. Qunibi W, Moustafa M, Muenz LR, He DY, Kessler PD, Diaz-Buxo JA *et al.* A 1-year randomized trial of calcium acetate versus sevelamer on progression of coronary artery

- calcification in hemodialysis patients with comparable lipid control: the Calcium Acetate Renagel Evaluation-2 (CARE-2) study. *Am J Kidney Dis* 2008; **51**: 952-965.
306. O'Neill WC, Lomashvili KA. Recent progress in the treatment of vascular calcification. *Kidney international* 2010; **78**: 1232-1239.
 307. Cicone JS, Petronis JB, Embert CD, Spector DA. Successful treatment of calciphylaxis with intravenous sodium thiosulfate. *Am J Kidney Dis* 2004; **43**: 1104-1108.
 308. Pasch A, Schaffner T, Huynh-Do U, Frey BM, Frey FJ, Farese S. Sodium thiosulfate prevents vascular calcifications in uremic rats. *Kidney international* 2008; **74**: 1444-1453.
 309. Wu SY, Zhang BH, Pan CS, Jiang HF, Pang YZ, Tang CS *et al*. Endothelin-1 is a potent regulator in vivo in vascular calcification and in vitro in calcification of vascular smooth muscle cells. *Peptides* 2003; **24**: 1149-1156.
 310. Dao HH, Essalihi R, Graillon JF, Lariviere R, De Champlain J, Moreau P. Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *Journal of hypertension* 2002; **20**: 1597-1606.
 311. Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD *et al*. Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation* 2005; **112**: 1628-1635.
 312. Helas S, Goettsch C, Schoppet M, Zeitz U, Hempel U, Morawietz H *et al*. Inhibition of receptor activator of NF-kappaB ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. *The American journal of pathology* 2009; **175**: 473-478.
 313. Fleckenstein-Grun G, Thimm F, Czirfuzs A, Matyas S, Frey M. Experimental vasoprotection by calcium antagonists against calcium-mediated arteriosclerotic alterations. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1994; **24 Suppl 2**: S75-84.
 314. Essalihi R, Zandvliet ML, Moreau S, Gilbert LA, Bouvet C, Lenoel C *et al*. Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension. *Journal of hypertension* 2007; **25**: 1879-1886.
 315. Motro M, Shemesh J. Calcium channel blocker nifedipine slows down progression of coronary calcification in hypertensive patients compared with diuretics. *Hypertension* 2001; **37**: 1410-1413.
 316. Ng K, Hildreth CM, Avolio AP, Phillips JK. Angiotensin-converting enzyme inhibitor limits pulse-wave velocity and aortic calcification in a rat model of cystic renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; **301**: F959-966.
 317. Armstrong ZB, Boughner DR, Drangova M, Rogers KA. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits arterial calcification in a pre-clinical model. *Cardiovascular research* 2011; **90**: 165-170.
 318. Cantini C, Kieffer P, Corman B, Liminana P, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Aminoguanidine and aortic wall mechanics, structure, and composition in aged rats. *Hypertension* 2001; **38**: 943-948.
 319. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation* 2004; **110**: 3480-3487.
 320. Chiou AC, Chiu B, Pearce WH. Murine aortic aneurysm produced by periarterial application of calcium chloride. *The Journal of surgical research* 2001; **99**: 371-376.

321. Atkinson J, Poitevin P, Chillon JM, Lartaud I, Levy B. Vascular Ca overload produced by vitamin D3 plus nicotine diminishes arterial distensibility in rats. *The American journal of physiology* 1994; **266**: H540-547.
322. Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Atkinson J. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine. *Journal of vascular research* 1997; **34**: 386-398.
323. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *American journal of hypertension* 2003; **16**: 103-110.
324. Spicer SS, Lewis SE, Tashian RE, Schulte BA. Mice carrying a CAR-2 null allele lack carbonic anhydrase II immunohistochemically and show vascular calcification. *The American journal of pathology* 1989; **134**: 947-954.
325. Ryden L, Standl E, Bartnik M, Van den Berghe G, Betteridge J, de Boer MJ *et al.* Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *European heart journal* 2007; **28**: 88-136.
326. Schram MT, Chaturvedi N, Fuller JH, Stehouwer CD. Pulse pressure is associated with age and cardiovascular disease in type 1 diabetes: the Eurodiab Prospective Complications Study. *Journal of hypertension* 2003; **21**: 2035-2044.
327. Giannattasio C, Failla M, Grappiolo A, Gamba PL, Paleari F, Mancina G. Progression of large artery structural and functional alterations in Type I diabetes. *Diabetologia* 2001; **44**: 203-208.
328. Brooks B, Molyneaux L, Yue DK. Augmentation of central arterial pressure in type 1 diabetes. *Diabetes care* 1999; **22**: 1722-1727.
329. Berry KL, Skyrme-Jones RA, Cameron JD, O'Brien RC, Meredith IT. Systemic arterial compliance is reduced in young patients with IDDM. *The American journal of physiology* 1999; **276**: H1839-1845.
330. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnema T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1996; **16**: 978-983.
331. Stehouwer CD, Henry RM, Ferreira I. Arterial stiffness in diabetes and the metabolic syndrome: a pathway to cardiovascular disease. *Diabetologia* 2008; **51**: 527-539.
332. Ronnback M, Fagerudd J, Forsblom C, Pettersson-Fernholm K, Reunanen A, Groop PH. Altered age-related blood pressure pattern in type 1 diabetes. *Circulation* 2004; **110**: 1076-1082.
333. Benetos A. Pulse pressure and arterial stiffness in type 1 diabetic patients. *Journal of hypertension* 2003; **21**: 2005-2007.
334. Kotsis V, Stabouli S, Karafillis I, Nilsson P. Early vascular aging and the role of central blood pressure. *Journal of hypertension* 2011; **29**: 1847-1853.
335. Nilsson PM, Boutouyrie P, Laurent S. Vascular aging: A tale of EVA and ADAM in cardiovascular risk assessment and prevention. *Hypertension* 2009; **54**: 3-10.

336. Everhart JE, Pettitt DJ, Knowler WC, Rose FA, Bennett PH. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes. *Diabetologia* 1988; **31**: 16-23.
337. Chen NX, Moe SM. Arterial calcification in diabetes. *Current diabetes reports* 2003; **3**: 28-32.
338. Jeffcoate WJ, Rasmussen LM, Hofbauer LC, Game FL. Medial arterial calcification in diabetes and its relationship to neuropathy. *Diabetologia* 2009.
339. Edmonds ME. Medial arterial calcification and diabetes mellitus. *Zeitschrift fur Kardiologie* 2000; **89 Suppl 2**: 101-104.
340. Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Tanaka N, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts accelerate calcification in microvascular pericytes. *Biochemical and biophysical research communications* 1999; **258**: 353-357.
341. Towler DA, Bidder M, Latifi T, Coleman T, Semenkovich CF. Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 1998; **273**: 30427-30434.
342. Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H2O2, and high intravascular pressure. *Circulation* 2005; **111**: 2364-2372.
343. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 2000; **102**: 2636-2642.
344. Towler DA, Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Loewy AP. Osteogenic regulation of vascular calcification. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; **1068**: 327-333.
345. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Moe SM. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 3435-3442.
346. Lewiecki EM. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; **7**: 631-638.
347. Bidder M, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Semenkovich CF, Towler DA. Osteopontin transcription in aortic vascular smooth muscle cells is controlled by glucose-regulated upstream stimulatory factor and activator protein-1 activities. *The Journal of biological chemistry* 2002; **277**: 44485-44496.
348. Mori S, Takemoto M, Yokote K, Asami S, Saito Y. Hyperglycemia-induced alteration of vascular smooth muscle phenotype. *Journal of diabetes and its complications* 2002; **16**: 65-68.
349. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *The Journal of biological chemistry* 2000; **275**: 20197-20203.
350. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circulation research* 2005; **96**: 717-722.

351. Shao JS, Sierra OL, Cohen R, Mecham RP, Kovacs A, Wang J *et al.* Vascular calcification and aortic fibrosis: a bifunctional role for osteopontin in diabetic arteriosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011; **31**: 1821-1833.
352. Araki N, Ueno N, Chakrabarti B, Morino Y, Horiuchi S. Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *The Journal of biological chemistry* 1992; **267**: 10211-10214.
353. Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *The Journal of biological chemistry* 1992; **267**: 5133-5138.
354. Mitsuhashi T, Nakayama H, Itoh T, Kuwajima S, Aoki S, Atsumi T *et al.* Immunochemical detection of advanced glycation end products in renal cortex from STZ-induced diabetic rat. *Diabetes* 1993; **42**: 826-832.
355. Zeng J, Dunlop RA, Rodgers KJ, Davies MJ. Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols. *The Biochemical journal* 2006; **398**: 197-206.
356. Kent MJ, Light ND, Bailey AJ. Evidence for glucose-mediated covalent cross-linking of collagen after glycosylation in vitro. *The Biochemical journal* 1985; **225**: 745-752.
357. Taki K, Takayama F, Tsuruta Y, Niwa T. Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Kidney international* 2006; **70**: 218-224.
358. Baidoshvili A, Niessen HW, Stooker W, Huybregts RA, Hack CE, Rauwerda JA *et al.* N(omega)-(carboxymethyl)lysine depositions in human aortic heart valves: similarities with atherosclerotic blood vessels. *Atherosclerosis* 2004; **174**: 287-292.
359. Wei Q, Ren X, Jiang Y, Jin H, Liu N, Li J. Advanced glycation end products accelerate rat vascular calcification through RAGE/oxidative stress. *BMC cardiovascular disorders* 2013; **13**: 13.
360. Tanikawa T, Okada Y, Tanikawa R, Tanaka Y. Advanced glycation end products induce calcification of vascular smooth muscle cells through RAGE/p38 MAPK. *Journal of vascular research* 2009; **46**: 572-580.
361. Ren X, Shao H, Wei Q, Sun Z, Liu N. Advanced glycation end-products enhance calcification in vascular smooth muscle cells. *The Journal of international medical research* 2009; **37**: 847-854.
362. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation* 1994; **93**: 2393-2402.
363. Schurgers LJ, Dissel PE, Spronk HM, Soute BA, Dhore CR, Cleutjens JP *et al.* Role of vitamin K and vitamin K-dependent proteins in vascular calcification. *Zeitschrift fur Kardiologie* 2001; **90 Suppl 3**: 57-63.
364. Parker BD, Schurgers LJ, Vermeer C, Schiller NB, Whooley MA, Ix JH. The association of uncarboxylated matrix Gla protein with mitral annular calcification differs by diabetes status: The Heart and Soul study. *Atherosclerosis* 2009; **210**: 320-325.

365. Bostrom KI, Jumabay M, Matveyenko A, Nicholas SB, Yao Y. Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus. *Circulation research* 2011; **108**: 446-457.
366. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yamamoto M, Kurioka S, Yano S *et al.* Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 2010; **22**: 187-194.
367. Horiuchi T, Kazama H, Araki A, Inoue J, Hosoi T, Onouchi T *et al.* Impaired gamma carboxylation of osteocalcin in elderly women with type II diabetes mellitus: relationship between increase in undercarboxylated osteocalcin levels and low bone mineral density. *Journal of bone and mineral metabolism* 2004; **22**: 236-240.
368. Kohlmeier M, Salomon A, Saupe J, Shearer MJ. Transport of vitamin K to bone in humans. *The Journal of nutrition* 1996; **126**: 1192S-1196S.
369. Sadowski JA, Hood SJ, Dallal GE, Garry PJ. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *The American journal of clinical nutrition* 1989; **50**: 100-108.
370. Niemeier A, Kassem M, Toedter K, Wendt D, Ruether W, Beisiegel U *et al.* Expression of LRP1 by human osteoblasts: a mechanism for the delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone. *J Bone Miner Res* 2005; **20**: 283-293.
371. Newman P, Bonello F, Wierzbicki AS, Lumb P, Savidge GF, Shearer MJ. The uptake of lipoprotein-borne phylloquinone (vitamin K1) by osteoblasts and osteoblast-like cells: role of heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Bone Miner Res* 2002; **17**: 426-433.
372. Georgopoulos A, Phair RD. Abnormal clearance of postprandial Sf 100-400 plasma lipoproteins in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of lipid research* 1991; **32**: 1133-1141.
373. Ebara T, Conde K, Kako Y, Liu Y, Xu Y, Ramakrishnan R *et al.* Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice. *The Journal of clinical investigation* 2000; **105**: 1807-1818.
374. Williams KJ, Liu ML, Zhu Y, Xu X, Davidson WR, McCue P *et al.* Loss of heparan N-sulfotransferase in diabetic liver: role of angiotensin II. *Diabetes* 2005; **54**: 1116-1122.
375. MacArthur JM, Bishop JR, Stanford KI, Wang L, Bensadoun A, Witztum JL *et al.* Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *The Journal of clinical investigation* 2007; **117**: 153-164.
376. Reaven EP, Reaven GM. Mechanisms for development of diabetic hypertriglyceridemia in streptozotocin-treated rats. Effect of diet and duration of insulin deficiency. *The Journal of clinical investigation* 1974; **54**: 1167-1178.
377. Schilling AF, Schinke T, Munch C, Gebauer M, Niemeier A, Priemel M *et al.* Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *J Bone Miner Res* 2005; **20**: 274-282.
378. Li Y, Lu W, King TD, Liu CC, Bijur GN, Bu G. Dkk1 stabilizes Wnt co-receptor LRP6: implication for Wnt ligand-induced LRP6 down-regulation. *PLoS one* 2010; **5**: e11014.

379. Al-Aly Z, Shao JS, Lai CF, Huang E, Cai J, Behrmann A *et al.* Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr-/- mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2007; **27**: 2589-2596.
380. Register TC, Hruska KA, Divers J, Bowden DW, Palmer ND, Carr JJ *et al.* Plasma Dickkopf1 (DKK1) concentrations negatively associate with atherosclerotic calcified plaque in African-Americans with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013; **98**: E60-65.
381. Kim KI, Park KU, Chun EJ, Choi SI, Cho YS, Youn TJ *et al.* A novel biomarker of coronary atherosclerosis: serum DKK1 concentration correlates with coronary artery calcification and atherosclerotic plaques. *Journal of Korean medical science* 2011; **26**: 1178-1184.
382. Knobloch J, Shaughnessy JD, Jr., Ruther U. Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway. *Faseb J* 2007; **21**: 1410-1421.
383. Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL *et al.* RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2006; **185**: 70-77.
384. Santilli F, Bucciarelli L, Noto D, Cefalu AB, Davi V, Ferrante E *et al.* Decreased plasma soluble RAGE in patients with hypercholesterolemia: effects of statins. *Free radical biology & medicine* 2007; **43**: 1255-1262.
385. Tan KC, Chow WS, Tso AW, Xu A, Tse HF, Hoo RL *et al.* Thiazolidinedione increases serum soluble receptor for advanced glycation end-products in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; **50**: 1819-1825.
386. Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V, Pete J, Thomas MC, Deemer ER *et al.* Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 2363-2372.
387. Cuccurullo C, Iezzi A, Fazia ML, De Cesare D, Di Francesco A, Muraro R *et al.* Suppression of RAGE as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in type 2 diabetes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006; **26**: 2716-2723.
388. Seyama Y, Kimoto S, Marukawa Y, Horiuchi M, Hayashi M, Usami E. Comparative effects of vitamin K2 and estradiol on experimental arteriosclerosis with diabetes mellitus. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung* 2000; **70**: 301-304.
389. Bouvet C, Peeters W, Moreau S, DeBlois D, Moreau P. A new rat model of diabetic macrovascular complication. *Cardiovascular research* 2007; **73**: 504-511.
390. Rocha E, Mello e Silva A, Gouveia-Oliveira A, Nogueira P. Isolated systolic hypertension--epidemiology and impact in clinical practice. *Rev Port Cardiol* 2003; **22**: 7-23.
391. Franklin SS. Elderly hypertensives: how are they different? *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)* 2012; **14**: 779-786.
392. Cameron JD, Bulpitt CJ, Pinto ES, Rajkumar C. The aging of elastic and muscular arteries: a comparison of diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes care* 2003; **26**: 2133-2138.
393. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 2001; **37**: 1053-1059.

394. Theilade S, Lajer M, Jorsal A, Tarnow L, Parving HH, Rossing P. Arterial stiffness and endothelial dysfunction independently and synergistically predict cardiovascular and renal outcome in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med*; **29**: 990-994.
395. McEniery CM, McDonnell BJ, So A, Aitken S, Bolton CE, Munnery M *et al.* Aortic calcification is associated with aortic stiffness and isolated systolic hypertension in healthy individuals. *Hypertension* 2009; **53**: 524-531.
396. Dudenbostel T, Glasser SP. Effects of antihypertensive drugs on arterial stiffness. *Cardiology in review* 2012; **20**: 259-263.
397. van Zwieten PA. Drug treatment of isolated systolic hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 2001; **16**: 1095-1097.
398. Wong ND, Lopez VA, L'Italien G, Chen R, Kline SE, Franklin SS. Inadequate control of hypertension in US adults with cardiovascular disease comorbidities in 2003-2004. *Archives of internal medicine* 2007; **167**: 2431-2436.
399. Amar J, Vaur L, Perret M, Bailleau C, Etienne S, Chamontin B. Hypertension in high-risk patients: beware of the underuse of effective combination therapy (results of the PRATIK study). *Journal of hypertension* 2002; **20**: 779-784.
400. Williams B. The aorta and resistant hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; **53**: 452-454.
401. Calhoun DA, Jones D, Textor S, Goff DC, Murphy TP, Toto RD *et al.* Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment. A scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* 2008; **51**: 1403-1419.
402. Protogerou A, Blacher J, Stergiou GS, Achimastos A, Safar ME. Blood pressure response under chronic antihypertensive drug therapy: the role of aortic stiffness in the REASON (Preterax in Regression of Arterial Stiffness in a Controlled Double-Blind) study. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; **53**: 445-451.
403. Way KJ, Katai N, King GL. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med* 2001; **18**: 945-959.
404. Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Oldfield M, Cooper M, Truong LD *et al.* Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *Faseb J* 2004; **18**: 176-178.
405. Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005; **25**: 932-943.
406. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *The Journal of clinical investigation* 1997; **100**: 115-126.
407. Canfield AE, Farrington C, Dziobon MD, Boot-Handford RP, Heagerty AM, Kumar SN *et al.* The involvement of matrix glycoproteins in vascular calcification and fibrosis: an immunohistochemical study. *The Journal of pathology* 2002; **196**: 228-234.
408. Furie B, Furie BC. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. *Blood* 1990; **75**: 1753-1762.

409. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* 1994; **43**: 1122-1129.
410. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; **89**: 11059-11063.
411. Engel GL, Farid NA, Faul MM, Richardson LA, Winneroski LL. Salt form selection and characterization of LY333531 mesylate monohydrate. *International journal of pharmaceutics* 2000; **198**: 239-247.
412. Grant S, Tran P, Zhang Q, Zou A, Dinh D, Jensen J *et al.* Discovery of a novel class of targeted kinase inhibitors that blocks protein kinase C signaling and ameliorates retinal vascular leakage in a diabetic rat model. *European journal of pharmacology* 2010; **627**: 16-25.
413. Kelly DJ, Zhang Y, Hepper C, Gow RM, Jaworski K, Kemp BE *et al.* Protein kinase C beta inhibition attenuates the progression of experimental diabetic nephropathy in the presence of continued hypertension. *Diabetes* 2003; **52**: 512-518.
414. Nonaka A, Kiryu J, Tsujikawa A, Yamashiro K, Miyamoto K, Nishiwaki H *et al.* PKC-beta inhibitor (LY333531) attenuates leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science* 2000; **41**: 2702-2706.
415. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A *et al.* Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science (New York, NY)* 1996; **272**: 728-731.
416. Tuttle KR, Anderson PW. A novel potential therapy for diabetic nephropathy and vascular complications: protein kinase C beta inhibition. *Am J Kidney Dis* 2003; **42**: 456-465.
417. Kim H, Sasaki T, Maeda K, Koya D, Kashiwagi A, Yasuda H. Protein kinase C beta selective inhibitor LY333531 attenuates diabetic hyperalgesia through ameliorating cGMP level of dorsal root ganglion neurons. *Diabetes* 2003; **52**: 2102-2109.
418. Kunisaki M, Bursell SE, Umeda F, Nawata H, King GL. Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. *Diabetes* 1994; **43**: 1372-1377.
419. Koya D, Lee IK, Ishii H, Kanoh H, King GL. Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d-alpha-tocopherol. *J Am Soc Nephrol* 1997; **8**: 426-435.
420. Lee IK, Koya D, Ishii H, Kanoh H, King GL. d-Alpha-tocopherol prevents the hyperglycemia induced activation of diacylglycerol (DAG)-protein kinase C (PKC) pathway in vascular smooth muscle cell by an increase of DAG kinase activity. *Diabetes research and clinical practice* 1999; **45**: 183-190.
421. Bursell SE, Clermont AC, Aiello LP, Aiello LM, Schlossman DK, Feener EP *et al.* High-dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type 1 diabetes. *Diabetes care* 1999; **22**: 1245-1251.

422. Jialal I, Devaraj S. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *The New England journal of medicine* 2000; **342**: 1917-1918.
423. Osicka TM, Yu Y, Lee V, Panagiotopoulos S, Kemp BE, Jerums G. Aminoguanidine and ramipril prevent diabetes-induced increases in protein kinase C activity in glomeruli, retina and mesenteric artery. *Clin Sci (Lond)* 2001; **100**: 249-257.
424. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *The New England journal of medicine* 2000; **342**: 145-153.
425. Ahimastos AA, Natoli AK, Lawler A, Blombery PA, Kingwell BA. Ramipril reduces large-artery stiffness in peripheral arterial disease and promotes elastogenic remodeling in cell culture. *Hypertension* 2005; **45**: 1194-1199.

