

CLAUDE CÔTÉ

**IMPACT DES DÉSORDRES MÉTABOLIQUES ET
RÔLE DE L'INFLAMMATION DANS LA
PHYSIOPATHOLOGIE DE LA STÉNOSE
AORTIQUE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en médecine expérimentale
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

© Claude Côté, 2008

Résumé

La sténose aortique (SA) est une maladie s'apparentant à l'athérosclérose caractérisée par la présence de lipoprotéines à l'intérieur de la valve, d'inflammation chronique, de remodelage et de calcification de la valve aortique. La SA est la première cause de remplacement valvulaire en Amérique du Nord et en Europe et il s'agit de la troisième maladie cardiovasculaire en importance après la maladie coronarienne et l'hypertension. Le seul traitement pour la SA sévère demeure le remplacement de la valve aortique. L'infiltration de lipoprotéines dans la valve aortique entraîne l'oxydation de ces lipoprotéines, qui sont alors à l'origine de la formation de cellules spumeuses et des processus d'inflammation chronique, de remodelage et de calcification. Les lipoprotéines, particulièrement des LDL oxydées (ox-LDL), peuvent être mesurés dans le plasma sanguin et ces ox-LDL sont en lien avec le remodelage de la valve et pourraient être un marqueur de ce processus dans la SA.

Abstract

Calcific aortic stenosis (AS) is a disease akin to atherosclerosis characterized by lipid infiltration, chronic inflammation, remodeling and calcification of the aortic valve. In North America and Europe, AS is the first cause of valvular replacement and the third cardiovascular disease in importance after coronary-artery disease and hypertension. The only treatment for severe AS remains aortic valve replacement. Lipoproteins infiltration in aortic valve leads to their oxidation which initiate foam cells formation, chronic inflammation, remodeling, and calcification of the aortic valve. Lipoproteins, mainly LDL, are prone to oxidation (ox-LDL) and may be measured in blood plasma. Plasma ox-LDL are associated with aortic valve remodeling and may be a potent marker of this process in AS.

Avant-propos

Ces deux années de maîtrise ont été des plus enrichissantes et m'ont permis d'apprendre énormément sur la sténose aortique, les troubles métaboliques, l'inflammation ainsi que sur le travail de laboratoire et la rigueur nécessaire pour mener à bien des recherches. Parmi les recherches auxquelles j'ai participé, celle-ci concernant le rôle des particules de LDL oxydées plasmatiques dans le remodelage de la valve aortique, a permis l'écriture d'un article.

L'élaboration de cette étude a été rendue possible grâce à la proche collaboration de trois équipes de recherches : la nôtre sous la direction du Dr Patrick Mathieu M.D., celle du Dr Jean-Pierre Després Ph.D. ainsi que celle du Dr Philippe Pibarot DVM. Le Dr Mathieu, mon directeur de recherche, a été l'investigateur principal de cette étude, j'ai beaucoup appris sous sa direction et j'ai participé à cette étude lors de l'analyse statistique ainsi que pour l'écriture de l'article et la présentation des résultats. J'aimerais profiter de cette occasion pour le remercier d'avoir cru en moi et de m'avoir donné une chance dans son équipe.

Le Dr Després. est l'un des co-investigateurs et une sommité mondiale dans l'étude des troubles métaboliques. Ses connaissances et son point de vue nous ont été précieux tout au long de l'étude et lors de l'écriture de cet article. Deux étudiants de l'équipe du Dr Després ont contribué de façon importante lors de cette étude. Amélie Cartier M.Sc a été responsable de certains dosages plasmatiques ainsi que des ELISA permettant de mesurer les particules de LDL oxydées plasmatiques. De son côté, Benoît Arsenault M.Sc. a mesuré la taille des particules de LDL.

Le Dr Philippe Pibarot, mon co-directeur de recherche, est lui aussi un co-investigateur et un très proche collaborateur. Son expertise dans la physiopathologie de la sténose aortique, autant du point de vue clinique que fondamental, est un atout de taille pour toutes nos recherches ainsi que pour cette étude. Le Dr Dania Mohty M.D., une brillante cardiologue qui termine son doctorat sous la co-direction du Dr Pibarot a aussi joué un rôle important dans cette étude. En effet, le Dr Mohty a analysé les échocardiographies pré-opératives de tous nos patients en plus de réaliser les mesures de calcium d'un des feuillets.

Nous avons aussi pu bénéficier de l'expertise du pathologiste Christian Couture M.D., qui a analysé chacune des valves explantées pour poser le diagnostic de sténose aortique ainsi que pour l'évaluation du score de remodelage et de calcification de la valve aortique.

Cette étude n'aurait pu être réalisé sans le recrutement des patients et le traitement des valves, je tiens donc à remercier Audrey Audet qui fait un excellent travail en remplissant ses différentes taches et qui a rendu mon travail d'autant plus facile. J'aimerais aussi souligner l'excellence du travail de Brigitte Dionne et de Stéphanie Dionne, qui nous ont permis d'avoir accès aux données cliniques des patients recrutés lors de cette étude. Un gros merci s'adresse aussi à Martine Fleury, qui est toujours là pour trouver une solution avec une rapidité qui m'étonne toujours.

Je tiens à remercier Andrée Pépin, qui grâce à ses connaissances et à son expérience en laboratoire, a su me guider et me conseiller lors de mes recherches. J'aimerais aussi remercier un ami précieux et un collègue tout aussi précieux, un gros merci à Allain Charest qui est toujours là pour m'aider, me comprendre et trouver des solutions à tous mes problèmes.

J'aimerais aussi remercier Marc-André, merci de m'encourager, merci de me soutenir, merci d'être si compréhensif, merci d'être là, tu donnes beaucoup de sens à ma vie.

Enfin, mille mercis à mes parents pour leur soutien et leur amour indéfectible, c'est grâce à vous si je me suis rendu jusque là et beaucoup grâce à vous si j'ai le sentiment de pouvoir aller plus loin.

À ma mère et à mon père

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Avant-propos.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	iii
Tableau 2 :.....	iii
caractéristiques du syndrome métabolique.....	page 36
.....	iii
Liste des figures.....	iii
Figure 2 :	iii
Mode d'action des statines sur la voie de synthèse du cholestérol.....	page 10
.....	iii
Figure 6 :	iii
remodelage d'un feuillet de valve aortique.....	page 26
.....	iii
Liste des abréviations	iv
Chapitre 1.....	1
1. Description de la sténose aortique	1
1.1.1 Données épidémiologiques	4
1.1.2 Évolution de la sténose aortique.....	5
1.1.3 Outils diagnostiques et suivi hémodynamique.....	6
1.2 Description de la sténose aortique d'un point de vue fondamental.....	8
1.2.1 Anatomie de la valve aortique normale	9
1.2.2 Anatomie de la valve aortique sténosée.....	10
1.2.3 Histologie de la valve sténosée	11
1.2.4 Traitement chirurgical de la sténose aortique.....	12
1.2.5 Médication et prévention de la progression de la sténose aortique.....	13
2. Remodelage et calcification de la valve aortique sténosée	17
2.1 Acteurs et mécanismes de la calcification.....	18
2.2 Remodelage de la valve aortique.....	24
3. L'inflammation dans la sténose aortique.....	26
3.1 Cellules inflammatoires impliquées et leurs rôles	26
3.1.1 Leucocytes.....	26
3.1.2 Cellules T.....	27
3.1.3 Macrophages.....	28
3.1.4 Mastocytes	29
3.2 Marqueurs inflammatoires et leurs rôles	31
3.2.1 Tumor Necrosis Factor.....	31
3.2.2 Protéine C-réactive.....	32
4. Sténose aortique et désordres métaboliques	33
4.1 Troubles lipidiques, rôles et importance dans la sténose aortique.....	36
4.1.1 LDL et LDL-cholestérol	37

4.1.1.1	Particules de LDL petites et denses.....	38
4.1.2	Particules de LDL oxydées.....	39
4.1.3	LDL oxydées plasmatiques.....	42
4.1.4	HDL.....	43
	Hypothèses.....	45
	Chapitre 2.....	47
2.1	Résumé.....	48
2.2	Title page.....	50
2.3	Abstract.....	52
2.3	Introduction.....	54
2.4	Material and methods.....	55
2.6	Discussion.....	65
2.8	Conclusion.....	70
2.9	Acknowledgements.....	71
2.10	Figures legend.....	72
2.11	Figure.....	73
2.12	Bibliography.....	74
	Chapitre 3.....	78
	Conclusion.....	78
	Bibliographie.....	84

Liste des tableaux

Tableau 1 :

Mesures échocardiographiques de la sévérité de la sténose aortique.....page 7

Tableau 2 :

caractéristiques du syndrome métabolique.....page 36

Tableau 3 :

critères de diagnostique du SM selon le NCEP-ATPIII modifiés selon l'American Heart Association.....page 37

Liste des figures

- Figure 1 :
anatomie du cœur.....page 3
- Figure 2 :
Mode d'action des statines sur la voie de synthèse du cholestérol.....page 10
- Figure 3 :
organisation des feuillets de la valve aortique.....page 13
- Figure 4 :
anatomie de la valve aortique normale.....page 15
- Figure 5 :
valve aortique normale versus sténosée.....page 16
- Figure 6 :
remodelage d'un feuillet de valve aortique.....page 26
- Figure 7 :
mécanismes potentiels d'initiation et de développement de la SA.....page 42

Liste des abréviations

ALP	phosphatase alcaline
Å	angstrom
ACE	<i>angiotensin converting enzyme - enzyme de conversion de l'angiotensine</i>
AngII	angiotensine II
ApoA-1	apolipoprotéine A1
Apo-B100	apolipoprotéine B100
ASTRONOMER	<i>Aortic Stenosis Progression Observation : Measuring the Effect of Rosuvastatin</i>
AVA	<i>aire valvulaire aortique</i>
BGP	bone Gla protein
BMI	body mass index
BMP	protéine morphogénétique osseuse - bone morphogenetic protein
CAD	coronary artery disease
CRP	protéine C-réactive
EBCT	electron-beam computed tomography
HDL	high density lipoprotein
HMG-CoA	hydroxyméthyl-coenzyme A
hsCRP	<i>high sensitivity CRP</i>
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL-1	interleukine 1
IL-6	interleukine 6
LDL	low-density lipoprotein
LDL-C	cholestérol lié au LDL
LDLr	récepteur des LDL
LOX-1	lectin-like ox-LDL receptor-1
LP(a)	lipoprotéine a
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MGP	<i>Matrix Gla protein - Gla-protéine matricielle</i>
mmHg	<i>millimètre de mercure</i>
mmLDL	minimally oxidized LDL
MMP	métalloprotéinase
NCEP-ATPIII	<i>National Cholesterol Education Program - Third Adult Treatment Panel</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa beta</i>
OPG	ostéoprotégérine
OPN	ostéopontine
ox-LDL	LDL oxydée
Pi	phosphate inorganique

PON	paraoxonase
PPi	pyrophosphate inorganique
PUFA	acide gras polyinsaturé - polyunsaturated fatty acid
RAAVE	<i>Rosuvastatin Affecting Aortic Valve Endothelium)</i>
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
RVA	remplacement valvulaire aortique
SA	sténose aortique
SALTIRE	<i>Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression</i>
SEAS	<i>Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis</i>
SM	syndrome métabolique
TG	triglycéride
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VG	ventricule gauche
VLDL	very low-density lipoprotein

Chapitre 1

Introduction

La sténose aortique calcifiée (SA) est une maladie qui affecte la valve aortique et qui se traduit par une diminution de l'aire valvulaire. Cette diminution est due à la sclérose ainsi qu'à la calcification des feuillets de la valve. Malheureusement, le seul traitement disponible pour la SA demeure le remplacement valvulaire. En Amérique du Nord seulement, la SA est responsable d'environ 15 000 décès et de 100 000 chirurgies chaque année. Étant donné le vieillissement de la population, il est estimé que ces chiffres devraient doubler d'ici l'an 2020. La SA est une maladie s'apparentant à l'athérosclérose où les désordres métaboliques sont impliqués au niveau de l'initiation et de la progression de la maladie. Au cours des dernières années, ces désordres métaboliques, tel que le diabète, le syndrome métabolique et une élévation du taux de cholestérol, ont tous pris des proportions épidémiques en Amérique du Nord et ailleurs dans le monde entier. Leur impact sur la SA dans les années à venir pourrait donc s'avérer être majeur en ce qui concerne l'apparition de nouveaux cas ainsi que sur la progression et la sévérité de la maladie.

1. Description de la sténose aortique

La SA affecte la valve aortique, qui se retrouve entre le ventricule gauche (VG) rempli de sang fraîchement oxygéné et l'aorte, qui est l'artère principale du coeur. La valve aortique est normalement composée de trois

feuillet, qui s'ouvrent lors de la systole, permettant ainsi au sang d'être éjecté du VG, et qui se referment lors de la diastole, empêchant au sang de retourner vers le VG. La SA peut se présenter sous trois formes : congénitale, rhumatismale et dégénérative. La forme congénitale affecte les gens qui sont nés avec une valve aortique bicuspidée, c'est-à-dire qui possède deux feuillets plutôt que trois. Environ 1 à 2% de la population possède une valve bicuspidée.¹ Les valves bicuspidées pourraient contribuer à créer un flot turbulent et ainsi expliquer la survenue de lésions valvulaires vers la cinquième décennie. Au fil du temps, cette usure entraîne la sclérose et la calcification ainsi qu'une mobilité réduite des feuillets de la valve. Environ 70% des patients qui ont une valve bicuspidée vont développer une sténose qui devra nécessiter un remplacement valvulaire aortique (RVA) 10 à 20 ans plus tôt que chez les patients possédant une valve tricuspide.¹ Jusque vers les années 1950, la maladie rhumatismale a été la première cause de SA. La maladie rhumatismale est due à une infection pharyngée par une bactérie, un streptocoque du groupe A. En conséquence à l'infection, chez certains patients une cardite rhumatismale se développe et pourra à long terme contribuer au développement d'une maladie valvulaire caractérisée, le plus souvent, par une régurgitation associée à une sténose. Par contre, depuis l'avènement des antibiotiques, principalement la découverte de la pénicilline, et depuis que la pharyngite streptococcique est mieux diagnostiquée, la prévalence de la SA rhumatismale a énormément décliné, ne représentant plus que 9% des causes de SA au début des années 1990.¹

Structures internes du coeur

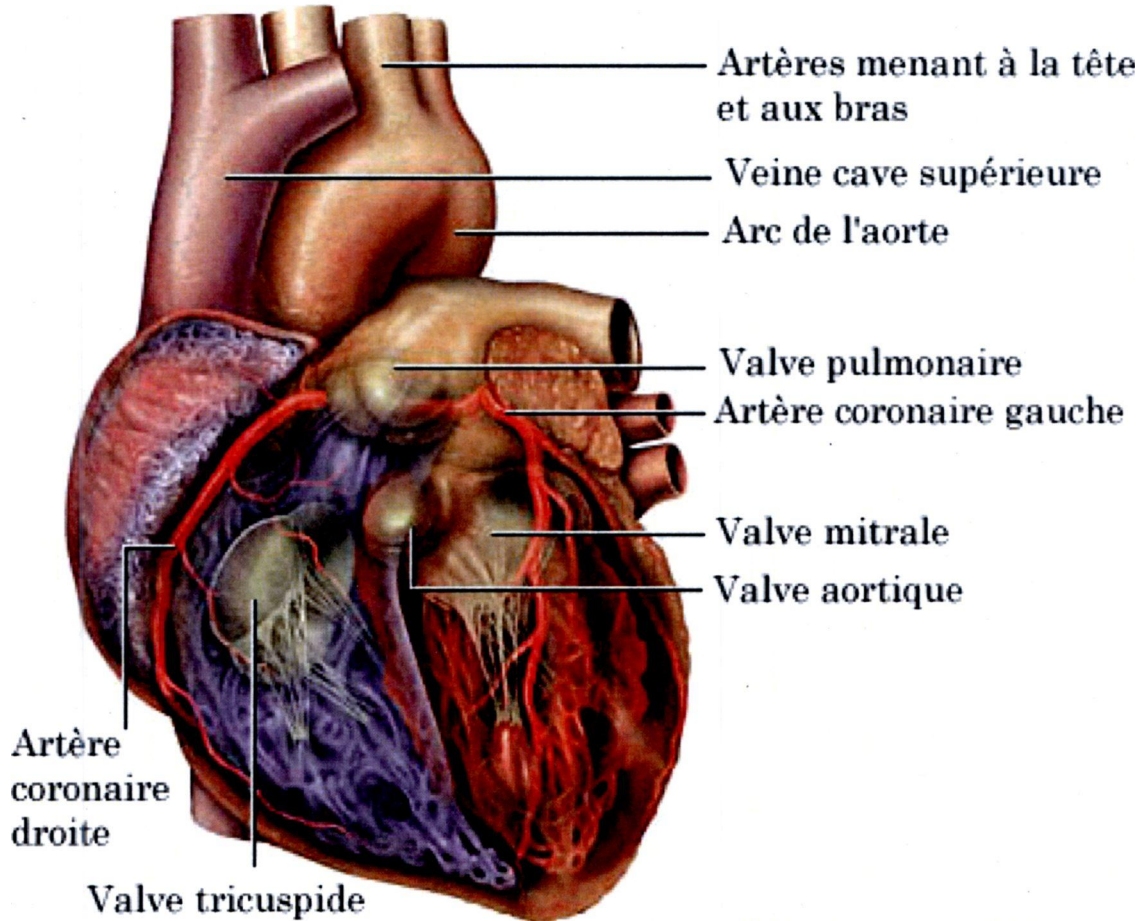


Figure 1 : anatomie du coeur.

Durant de nombreuses années la SA calcifiée a été considérée comme étant une maladie dégénérative due au vieillissement des feuillets, qui souffraient d'usure à force de s'ouvrir et de se refermer et sur lesquels des cristaux de calcium finissaient par se déposer de manière passive. Depuis quelques années, il a été démontré que la SA est due à un processus actif s'apparentant à l'athérosclérose, où la présence de dépôts lipidiques, l'inflammation chronique ainsi que le remodelage et la calcification active sont à l'origine de son initiation et de sa progression.²⁻⁶ L'épaississement, ou la sclérose, des feuillets ainsi que les dépôts de calcium entraînent alors un durcissement de la valve, ce qui a pour effet de diminuer sa capacité à s'ouvrir

et se refermer correctement. Par le fait même, l'aire valvulaire, c'est-à-dire l'orifice disponible pour laisser le sang circuler lorsque la valve est ouverte, est réduite, ce qui aura à long terme un impact important sur les fonctions du cœur. Tout au long de ce mémoire, il sera question de cette forme de SA, l'utilisation de l'abréviation « SA » fera donc référence à la sténose aortique calcifiée.

1.1.1 Données épidémiologiques

Documentée pour la première fois en 1646 par le docteur Lazare Rivière⁷, la SA a été considérée pendant de nombreuses années comme étant un désordre passif dû à la dégénérescence des feuillets. De nos jours, la SA est la maladie valvulaire la plus répandue dans les pays occidentaux. Aux États-Unis, il s'agit de la troisième maladie cardiovasculaire en importance après l'hypertension et la maladie coronarienne^{8,9} et il s'agit aussi de la première cause de RVA, autant en Amérique du Nord qu'en Europe. À chaque année aux États-Unis, environ 50 000 personnes doivent subir un RVA pour cause de SA sévère. La prévalence de la SA augmente en fonction de l'âge. Dans une population âgée de 65 ans et plus, la prévalence de la SA sévère est de 2 à 5%.^{10,11} La sclérose de la valve aortique, qui pourrait être considérée comme étant un stade précoce du développement de la SA, affecte 20 à 30% des personnes âgées de 65 ans et 48% des gens âgés de 85 ans.¹² Par conséquent, le vieillissement de la population a pour effet d'augmenter l'incidence des pathologies de la valve aortique. Étant donné que l'on estime que près du quart de la population sera âgée de soixante-cinq ans ou plus en 2030, la SA pourrait s'avérer avoir des impacts considérables sur les soins de santé ainsi que sur leur coût.

1.1.2 Évolution de la sténose aortique

Tout comme dans le cas de l'athérosclérose, les patients souffrant de SA peuvent vivre des années avec cette maladie sans développer de symptômes. Lorsqu'ils apparaissent, les symptômes cardinaux d'une SA sévère sont l'angine, l'insuffisance cardiaque congestive ainsi que la syncope. D'autres symptômes plus subtils peuvent aussi être observés, tel qu'une diminution de la tolérance à l'exercice ou de la dyspnée d'effort.¹³ Suite à l'apparition des symptômes, le seul traitement existant présentement demeure la chirurgie de RVA. Plusieurs études ont démontré que sans le RVA le pronostic est sombre. En effet, chez des patients ayant refusé le traitement chirurgical, la moyenne du temps de survie est de seulement deux ans, et le taux de survie après 5 ans est inférieur à 20%.¹⁴ Pour sa part, une autre étude a démontré que les patients souffrant de SA sévère et ayant des symptômes avaient un taux de survie de 40% après 2 ans et que seulement 12% n'avaient expérimenté aucune manifestation après 5 ans de suivi médical.¹⁵ Par contre, suite au RVA, il a été démontré que le taux de survie post-opératoire corrigé pour l'âge s'avère être pratiquement normalisé.¹⁶ Par contre, même en l'absence de symptômes, il a été démontré que les patients avec sclérose de la valve aortique voient leur risque de décéder d'une cause cardiovasculaire ou de faire un infarctus du myocarde augmenté de 50%. Ce risque est présent même si les patients avec sclérose ne démontrent aucun signe d'obstruction de la circulation sanguine à travers la valve aortique.¹² Par conséquent, il est suspecté que la sclérose de la valve aortique pourrait représenter un marqueur d'un processus athérosclérotique généralisé.

1.1.3 Outils diagnostiques et suivi hémodynamique

Plusieurs méthodes permettent de diagnostiquer et d'évaluer la progression et la sévérité de la SA. Ces outils sont aussi utilisés pour déterminer le moment de recourir à la chirurgie pour le RVA. La technique de loin la plus couramment utilisée est l'échocardiographie Doppler, qui est non invasive. Le cathétérisme cardiaque, une méthode invasive, est aussi parfois utilisé pour confirmer le diagnostic de sévérité de la SA lorsque les données échocardiographiques ne sont pas concluantes.

Au cours de son développement, la SA affecte l'aire valvulaire, soit la surface d'ouverture de la valve aortique. Puisque la fibrose et l'accumulation de nodules de calcification font en sorte que les feuillets de la valve perdent de leur élasticité et deviennent plus volumineux, ils ne sont donc plus en mesure de s'ouvrir correctement. L'aire valvulaire d'une valve normale est de 2 à 4 cm² et lorsque l'aire valvulaire est réduite à une valeur en deçà de 1,5 cm², il y alors apparition d'un gradient de pression. Cela augmente la pression intracavitair et donc la postcharge du VG. Cette augmentation de postcharge du ventricule conduit à une augmentation du travail myocardique et à une hypertrophie compensatrice du VG. Le diagnostic ainsi que le suivi de la progression et de la sévérité de la SA peuvent être établi de manière précise et fiable grâce à l'échocardiographie-Doppler. Pour ce faire, différentes mesures peuvent être prisent tel que la vélocité sanguine dans le jet transvalvulaire, le gradient de pression transvalvulaire ainsi que l'aire valvulaire.

La vélocité, c'est-à-dire la vitesse du flux sanguin qui passe du VG à l'aorte en traversant la valve aortique, peut être mesurée par échocardiographie et est exprimée en mètres par seconde. Dans le cas de la SA, le rétrécissement de l'orifice de la valve aortique fait en sorte que le flux

sanguin est accéléré. Cet accroissement de la vitesse est donc un indicateur de la progression et de la sévérité de la maladie. Le gradient est pour sa part une mesure des différences de pressions entre le VG et l'aorte exprimé en millimètres de mercure (mmHg). Le gradient est aussi en relation avec la vitesse, il est décrit par l'équation de Bernoulli comme étant 4 fois la vitesse au carré. Un autre indicateur de la maladie consiste à mesurer l'aire valvulaire, qui peut être effectué de plusieurs manières : par échocardiographie-Doppler, par l'équation de continuité, par cathétérisme cardiaque, en utilisant l'équation de Gorlin, ou encore en planimétrie. La mesure de l'aire valvulaire par cathétérisme peut entraîner certains risques pour le patient tel que celui d'embolie cérébrale chez les patients souffrant de SA sévère.^{17,18} La valeur de l'aire valvulaire est un indicateur qui peut s'avérer important lorsque les fonctions du VG sont détériorées. En effet, la vitesse et le gradient sont hautement dépendants du débit sanguin. Si le débit diminue en raison d'une détérioration de la fonction du VG, cela pourrait masquer ou sous-estimer la progression de la sténose. Malgré le fait que la grande majorité des patients deviennent symptomatiques lorsque la SA est sévère, l'apparition des symptômes ne correspond pas toujours à une valeur clinique précise chez tous les patients. Il existe toutefois certaines lignes directrices permettant d'établir la sévérité de la maladie. Ces indications, provenant des mesures échocardiographiques, sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Mesures échocardiographiques de la sévérité de la sténose aortique

	SA légère	SA modérée	SA sévère
Vitesse du jet aortique (m/s)	<3,0	3,0-4,0	>4,0
Gradient moyen (mmHg)	<25	25-40	>40
Aire valvulaire (cm ²)	1,5-2,0	1,0-1,5	<1,0

Tiré de Bonow B. et al.¹⁹

Plusieurs études prospectives ont permis d'établir le taux de progression hémodynamique chez les patients souffrant de SA. En moyenne, la vitesse du jet aortique

augmente de 0,3 m/s par année, le gradient moyen de pression trans-aortique augmente à raison de 7 mmHg, alors que l'aire valvulaire décroît en moyenne de 0,1 cm² par année.²⁰⁻²³ Malgré le fait que ces moyennes sont similaires entre les différentes études, il n'en demeure pas moins qu'il y a une importante variation inter-individuelle, ce qui rend difficile la prédiction de la progression hémodynamique de la SA.

1.2 Description de la sténose aortique d'un point de vue fondamental

La SA entraîne de nombreux changements de la valve aortique. Au niveau tissulaire et cellulaire, une multitude de processus sont mis en branle et impliquent la participation de plusieurs acteurs différents. Tout comme dans le cas de l'athérosclérose, les lésions au niveau de l'endothélium et l'entrée subséquente de lipides déclenchent une réponse inflammatoire qui fait intervenir plusieurs cellules. Cette réponse implique non seulement les cellules constituant la valve elle-même mais aussi des cellules recrutées dans la valve. Cet état inflammatoire inclut aussi plusieurs cytokines et protéines qui jouent un rôle prépondérant autant dans l'inflammation que dans la calcification et le remodelage de la valve.

1.2.1 Anatomie de la valve aortique normale

La valve aortique est située à l'intérieur de l'aorte près du VG. La valve aortique normale est lisse, mince et opalescente et est constituée de trois feuillets. Les feuillets de la valve aortique ont une forme semi-lunaire et le bord

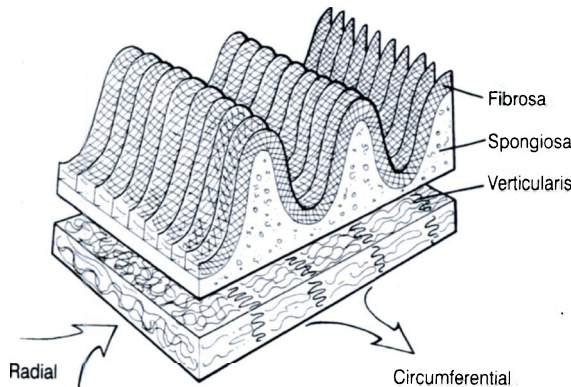


Figure 3 : organisation des feuillets de la valve aortique.

libre du feuillet est dirigé vers l'intérieur du vaisseau. Un feuillet de valve aortique est composé de 3 couches, la ventricularis, la spongiosa et la fibrosa. La ventricularis est la partie faisant face au VG, elle est composée de fibres riches en élastine, qui sont alignés de manière radiale perpendiculairement à la marge du feuillet. La fibrosa est la couche de la

valve aortique faisant face à l'aorte. Cette couche est constituée principalement de fibres de collagène et de fibroblastes. Les fibres de collagènes sont situées près de la circonférence et sont parallèles par rapport à la marge du feuillet. La solidité de la valve est principalement expliquée par la constitution de la fibrosa. En effet, sa rigidité minimise l'affaissement du centre du feuillet et empêche ainsi les régurgitations. Enfin, la spongiosa, qui est constituée en majeure partie de tissu conjonctif lâche, est située à la base du feuillet entre la fibrosa et la ventricularis. La spongiosa contient également des fibroblastes, des glycosaminoglycans, d'un peu de collagène et elle est composée d'une matrice riche en mucopolysaccharides. La valve aortique peut parfois contenir de rares myofibroblastes, soit une forme de fibroblastes s'étant partiellement différenciés en cellules possédant certains marqueurs de cellules musculaires lisses. Les feuillets de la valve sont aussi tapissés d'une couche de cellules endothéliales, qui jouent un rôle important dans la SA puisque les dysfonctions

endothéliales ainsi que les dommages à l'endothélium sont souvent mis en cause dans l'initiation et la progression de la maladie athéromateuse et la SA. Enfin, cet assemblage permet à la valve aortique d'être à la fois résistante à la traction et flexible afin de pouvoir répéter le même mouvement d'ouverture et de fermeture pendant plusieurs décennies.

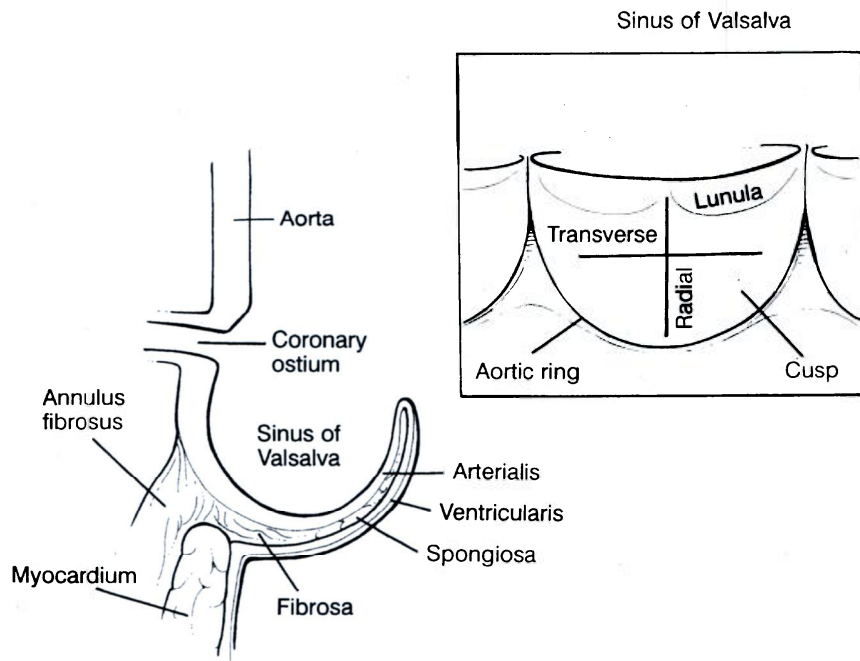


Figure 4 : anatomie de la valve aortique normale

1.2.2 Anatomie de la valve aortique sténosée

Avant d'atteindre le stade de sténose, la valve aortique montre des signes de sclérose, où il y a une prolifération du tissu conjonctif et une induration des feuillets, ce qui affecte l'élasticité de la valve aortique. Le développement de la SA entraîne une calcification parfois abondante des feuillets de la valve et cette calcification peut s'étendre à tous les feuillets de la valve, mais épargne en général le bord libre des feuillets. De plus, la présence

des nodules de calcification, qui sont des amas de calcium à l'intérieur des feuillets de la valve, est habituellement observée du côté aortique, où l'on retrouve des courants de vortex à faible vélocité en diastole. La faible vélocité des fluides en diastole permet aux lipides et aux cellules inflammatoires de pénétrer dans les tissus valvulaires.

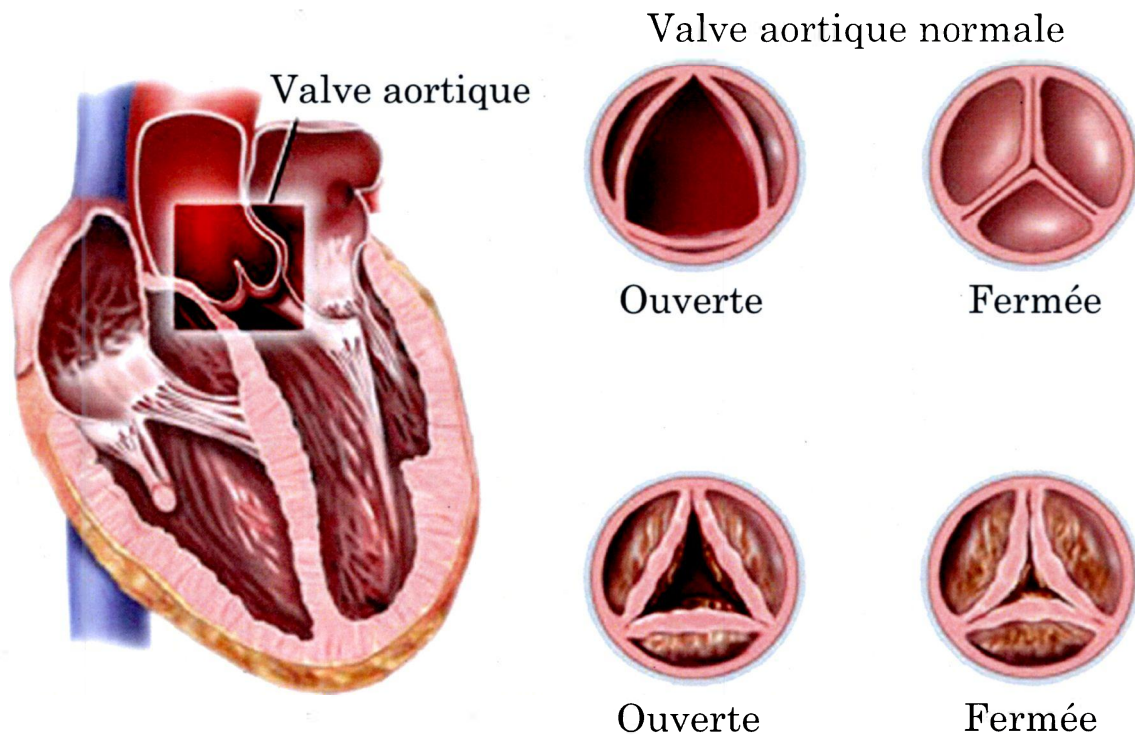


Figure 5 : valve aortique normale versus sténosée

1.2.3 Histologie de la valve sténosée

Lorsque la valve aortique est affectée par la sténose, il y a un épaissement des feuillets ainsi que la présence de masses nodulaires. D'un point de vue microscopique, les valves sténosées ont une perturbation de la membrane basale et de l'endothélium avec un épaissement de la couche sous-endothéliale. Les régions atteintes de la valve, décrites comme étant des

nodules, contiennent des fibres de collagène désorganisées, des cellules inflammatoires, des lipoprotéines, des lipides, des protéines de matrice extracellulaire osseuse ainsi que des minéraux osseux.² À l'origine, les lésions apparaissent sur les feuillets du côté aortique de la valve pour ensuite s'étendre dans la fibrosa.

1.2.4 Traitement chirurgical de la sténose aortique

Le seul traitement qui s'offre actuellement aux patients souffrant de SA sévère est le RVA. Suite à l'apparition de symptômes, sans le recours à une intervention chirurgicale le pronostic est peu encourageant pour les patients. En effet, sans RVA, seulement 5 ans après le début des symptômes, le taux de survie est inférieur à 20%.¹⁴ Par contre, pour les patients souffrant de SA symptomatique et qui subissent un RVA, le pronostic vital est très bon. En effet, la mortalité opératoire pour un RVA est d'environ 1% et peut atteindre 9% chez les patients à hauts risques. De plus, suite à la chirurgie, la survie à long terme est de 80% après 3 ans et la survie post-opératoire est pratiquement normalisée lorsqu'il y a correction en fonction de l'âge.¹⁶

Il existe principalement quatre avenues proposées au patient en vue d'un remplacement de la valve aortique : la bioprothèse, la valve mécanique, l'homogreffe et l'autogreffe pulmonaire. L'homogreffe est en fait la greffe d'une valve aortique provenant d'un cadavre humain. Dans le cas de l'autogreffe pulmonaire, il s'agit de remplacer la valve aortique malade du patient par sa propre valve pulmonaire alors que sa valve pulmonaire doit être remplacée par une homogreffe. Pour ce qui est de la valve mécanique, il s'agit d'une valve composée entièrement de matériaux artificiels et non biologiques. Enfin, la bioprothèse est constituée soit d'une valve d'origine porcine ou fabriqué à partir de péricarde de veau. Ces tissus sont fixés dans le glutaraldéhyde afin d'éviter le rejet puis ils sont montés sur une armature synthétique. L'utilisation du

glutaraldéhyde a pour effet de diminuer l'immunogénicité des bioprothèses puisque celui-ci entraîne la formation de réseaux et masque ainsi les antigènes. {Villa et al., 1980, Tissue Antigens, 16, 62-9, Okamura et al., 1980, Surgery, 87, 170-6} Bien évidemment ces options possèdent des avantages et des désavantages et il appartient au chirurgien et son patient de déterminer quel substitut convient le mieux compte tenu des caractéristiques du patient tel que l'âge, le niveau d'activité physique et les facteurs de risque.

1.2.5 Médication et prévention de la progression de la sténose aortique

Il n'existe actuellement aucun traitement prescrit dans le cas de la SA pour ralentir sa progression. Plusieurs études ont été réalisées chez des patients souffrant d'athérosclérose pour tenter d'empêcher la progression et même pour tenter de faire régresser la maladie. Étant donné que l'hypercholestérolémie est mise en cause autant dans le cas d'athérosclérose que dans celui de la SA^{24,25}, il a été supposé que l'utilisation d'une médication visant à traiter l'hypercholestérolémie chez les patients souffrant de SA pourrait ralentir la progression de la maladie. La plupart de ces études²⁶⁻³⁰ ont visé à réduire le taux de cholestérol par l'utilisation d'inhibiteurs de l'hydroxyméthyl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, mieux connus sous l'appellation de *Statines*. Les statines limitent la synthèse du cholestérol, ce qui permet d'abaisser le cholestérol plasmatique.³¹ De plus, les statines induisent une plus grande captation des LDL (*low-density lipoprotein*) par l'augmentation du nombre de leurs récepteurs hépatiques.³² Des études cliniques ont démontré que les statines, principalement via la réduction des niveaux de LDL sériques, permettent de réduire la mortalité chez les patients atteints d'une maladie athéromateuse.^{26,27,33}

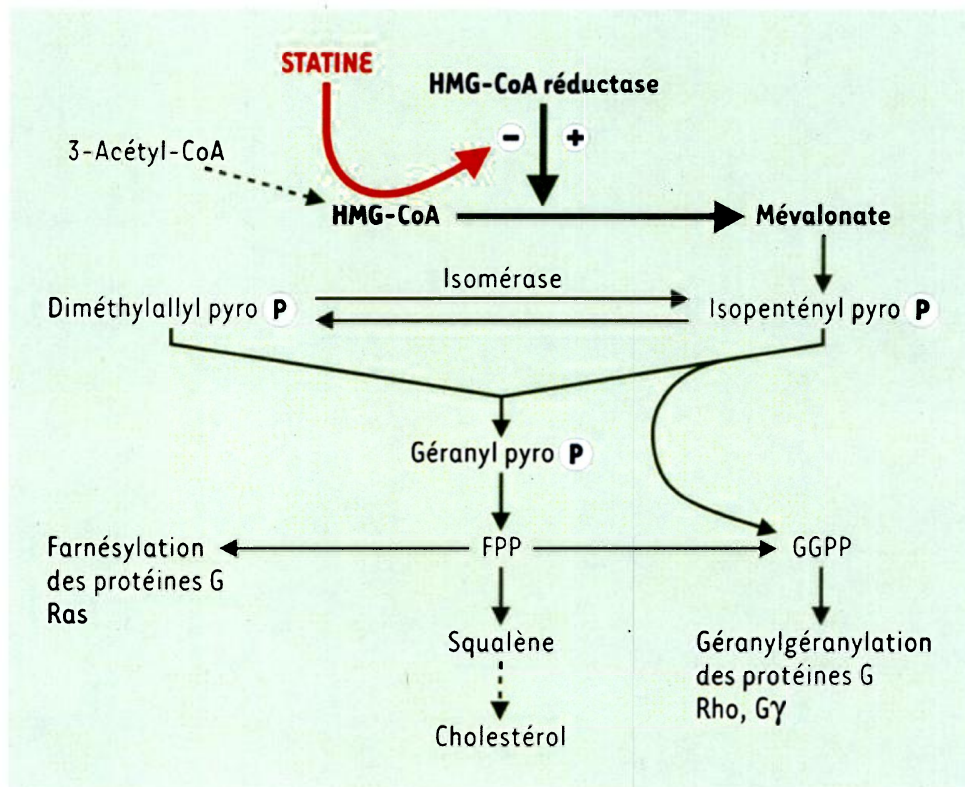


Figure 2 : Mode d'action des statines sur la voie de synthèse du cholestérol.
Figure tirée de Nalbone G. et al.³⁴

Des modèles animaux de SA sont aussi venus étayer la thèse que l'utilisation des statines pourraient ralentir progression de la SA.^{35,36} Drolet et al. ont réussi à initier une SA chez le lapin au moyen d'une diète riche en cholestérol et en vitamine D₂.³⁷ Cette diète avait pour effet de faire augmenter les niveaux sanguins de cholestérol et de calcium.³⁷ Dans un modèle expérimental similaire, de lapin hypercholestérolémique avec lésions athérosclérotiques au niveau de la valve aortique, il a été démontré que l'administration d'une statine, l'atorvastatine, avait pour effet de diminuer la prolifération cellulaire ainsi que la production de matrice osseuse dans la valve aortique.³⁶ Plusieurs études cliniques rétrospectives ont montré une association entre la prise d'une statine et une progression plus lente de la SA.³⁸⁻⁴³ Bien que la maladie semblait être ralentie chez les patients sous statine, il existait peu

ou pas de corrélations entre le ralentissement de la progression et l'abaissement du taux de cholestérol sérique.^{39,41-43} Les effets observés sur la progression de la SA pourraient s'expliquer par les effets pléiotropiques des statines, qui iraient bien au-delà de l'abaissement du taux de cholestérol et qui pourraient inclure l'amélioration de la fonction endothéliale, des actions anti-thrombotiques, un effet stabilisateur de la plaque, des effets anti-oxydants ainsi que des effets anti-inflammatoires.⁴⁴

Les résultats d'une des études les plus attendues ont été dévoilés en juin 2005 : l'étude SALTIRE (*Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression*), la première étude randomisée prospective, qui visait à vérifier si un traitement à haute dose d'une statine (atorvastatin 80 mg/jour) pourrait stopper la progression ou induire la régression de la SA. Malheureusement, l'étude SALTIRE n'a pas donné les résultats escomptés. Après un traitement et un suivi moyen de 2 ans, les patients sous statine n'ont pas eu une progression de la SA différente de ceux sous placebo. Ce traitement n'a donc pas permis de ralentir la progression de la SA et l'utilisation de la statine n'a pas été recommandée pour les patients souffrant de SA en l'absence d'autres maladies vasculaires.⁴⁵

Les résultats d'une deuxième étude prospective visant à mesurer les effets d'une statine sur la progression de la SA ont été connus en février 2007. L'étude RAAVE⁴⁶ (*Rosuvastatin Affecting Aortic Valve Endothelium*) dont le but était de mesurer par échocardiographie l'effet d'une statine, la rosuvastatine, sur la progression hémodynamique d'une SA modérée à sévère. Cette étude visait aussi à mesurer certains marqueurs inflammatoires (hsCRP (*high sensitivity CRP*), IL-6 et sCD40L). Cette étude non randomisée a porté sur 121 patients avec une SA modérée à sévère, c'est-à-dire avec une valeur d'aire valvulaire se situant entre 1,0 et 1,5 cm². Le traitement sous statine a été établi sur la base du cholestérol élevé (>130 mg/dl) suivant les

recommandations du NCEP-ATPIII (*National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel*). Le groupe ayant une hypercholestérolémie était traité à l'aide la statine, alors que le groupe contrôle normocholestérolémique n'était pas traité. Cette étude a démontré que le traitement avec la rosuvastatine permettait de ralentir la progression de la SA en fonction des valeurs hémodynamiques mesurées par échocardiographie (aire valvulaire annualisée (AVA), gradient moyen, gradient maximum et vélocité du jet). Le traitement sous statine a également permis d'abaisser les marqueurs inflammatoires. Cette étude tend donc à démontrer que chez les patients hypercholestérolémiques, le traitement à l'aide d'une statine ralentit la progression clinique de la SA. Par contre, il est important de mentionner que de nos jours la plupart des patients qui doivent subir un RVA sont déjà sous statine et que la plupart ont déjà atteint les taux de LDL-C recommandés. La statine pourrait donc ralentir la progression de la SA chez certains patients, mais la majorité verront tout de même leur maladie progresser vers une SA sévère nécessitant un RVA.

Les divergences observées entre l'étude SALTIRE et l'étude RAAVE peuvent s'expliquer entre autres par le fait que dans le cas de l'étude SALTIRE les patients étaient atteints d'une SA plus sévère. En effet, l'aire valvulaire moyenne des patients était de 1,03 cm² dans l'étude SALTIRE et de 1,23 cm² dans l'étude RAAVE. Aussi, dans l'étude SALTIRE les patients qui étaient déjà sous traitement avec une statine où encore ceux qui auraient pu bénéficier d'un traitement de statine en raison d'une condition préexistante ont été exclus de l'étude. D'autres études prospectives randomisées (SEAS – *Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis* et ASTRONOMER – *Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring the Effect of Rosuvastatin*) sont en cours et visent aussi à mesurer l'effet des statines dans la progression de la SA. Ces résultats sont très attendus et devraient être connus au courant de l'année 2007 et 2008

2. Remodelage et calcification de la valve aortique sténosée

La calcification est un processus hautement régulé qui, chez l'humain, est au cœur de l'ostéogénèse, soit la formation des os, et de l'odontogénèse, la formation des dents. Ces deux processus se ressemblent énormément et font intervenir en grande partie les mêmes acteurs. La calcification dans un contexte pathologique, comme c'est le cas dans la SA et l'athérosclérose, s'apparente à la calcification normale et les études, visant à comprendre la calcification valvulaire et vasculaire, sont basées sur les connaissances acquises dans l'ostéogénèse. La formation des os tient à un équilibre finement régulé de déposition et de résorption du calcium. Trois types cellulaires sont impliqués spécifiquement dans le processus de calcification : les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes. Les ostéoblastes sont de jeunes cellules osseuses, précurseurs des cellules osseuses matures appelées ostéocytes. Pour leur part, les ostéocytes sont des cellules matures ayant migrées dans la matrice osseuse et qui deviennent incluses dans cette matrice osseuse qu'elles produisent elles-mêmes. Enfin, les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse, c'est-à-dire de la solubilisation de la matière minéralisée de l'os. Ces cellules jouent ainsi un rôle important dans le remodelage de l'os en relâchant le calcium dans la circulation sanguine, ce qui est fondamental dans la régulation de l'équilibre du calcium. La matrice qui constitue la majeure partie de l'os est composée de parties organiques et inorganiques. La partie inorganique est majoritairement constituée d'hydroxyapatite, un phosphate de calcium que l'on retrouve dans le cristal osseux des os et des dents. La partie organique de la matrice est pour sa part principalement composée de collagène de type I. Le processus de calcification nécessite ensuite l'apport d'une d'autres cellules, de facteurs de croissance, de cytokines, et autres molécules qui pour la

plupart jouent aussi un rôle dans le développement pathologique de calcifications.

La calcification est une caractéristique de la SA et est présente principalement près des régions où l'on remarque de l'inflammation ainsi que des dépôts lipidiques. Dans la SA, il s'agit d'un trait marquant, qui est observé autant dans les lésions précoces que dans celles d'un stade avancé de la maladie.^{2,47} Dans certaines valves il y a même la présence de zones d'os lamellaire, soit un tissu osseux mature, qui nécessite du temps pour se former et dont la structure est régulière. Ces valves peuvent également contenir de la moelle hématopoïétique.⁴⁷ Donc, lorsque la valve aortique est affectée par la SA tout porte à croire qu'il y a présence d'un processus actif, hautement régulé, qui s'apparente à la formation osseuse. La présence de calcifications dans la SA joue un rôle très important puisqu'il s'agit d'un facteur décisif dans la rigidité des feuillets de la valve et dans le développement d'une SA sévère.⁴⁸⁻⁵⁰

2.1 Acteurs et mécanismes de la calcification

Les dépôts de calcium, retrouvés au niveau de la valve aortique dans la SA, contiennent du calcium ainsi que du phosphate tel que l'hydroxyapatite, un phosphate de calcium normalement présent dans l'os. Plusieurs protéines impliquées dans les processus de calcification liés à la SA et à l'athérosclérose, sont les mêmes qui sont impliquées dans les processus normaux de minéralisation des os. Dans le cas de la calcification dans un contexte pathologique les mêmes acteurs sont mis en cause. Un déséquilibre dans la balance entre ces facteurs pro- et anti-calcifiants entraîne la présence de calcifications ectopiques, tel que celles retrouvées au niveau de la plaque athéromateuse ou de la valve aortique dans la SA.

Autant dans le cas de l'athérosclérose que dans celui de la SA, les nodules de calcification font leur apparition dans les zones infiltrées par des lipides, particulièrement lorsque ces lipides sont oxydés.^{4,5} Cette infiltration de lipides entraîne le déclenchement d'une réponse inflammatoire ainsi que le recrutement de cellules inflammatoires au site de la lésion. Dans le cas de la SA, les fibroblastes valvulaires vont, en réponse aux lipides oxydés, à TGF- β 1, BMP2 et RANK, augmenter l'expression des marqueurs ostéoblastiques.^{51,52}

Parmi les protéines qui jouent un rôle dans la calcification valvulaire en tant que régulateurs anti-calcifiants, il y a l'ostéopontine (OPN), aussi connue sous le nom de *bone sialoprotein I*, une phosphoprotéine glycosylée non collagèneuse et un constituant majeur de la matrice de l'os minéralisé. L'OPN se lie aux intégrines, dont l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui est le type principal d'intégrine retrouvé à la surface des cellules ostéoclastiques. Les intégrines sont cruciales dans la migration des ostéoclastes vers les sites de résorption ainsi que dans l'attachement au tissu osseux. L'OPN a été retrouvée dans différents tissus, dans les cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que dans les macrophages activés.⁵³ L'OPN a aussi été identifiée dans les plaques athéromateuses calcifiées chez l'humain.⁵⁴⁻⁵⁶ Dans la valve aortique, l'OPN peut être produite par des macrophages, puisque ces cellules inflammatoires ont la capacité de la sécréter.⁵⁷ Des macrophages exprimant de l'OPN ont été retrouvés dans des lésions de valves aortiques ainsi que dans des plaques athéromateuses.^{54,55} Il a aussi été démontré qu'il existait une association entre le degré d'expression d'OPN, le niveau de calcification et l'accumulation de macrophages dans la valve aortique calcifiée.⁵⁵ Il a été démontré que les macrophages retrouvés dans la valve aortique expriment de l'OPN, qui est responsable non seulement d'inhiber la calcification, mais aussi de promouvoir la sortie du calcium par l'acidification de la matrice extracellulaire.⁵⁸ *In vivo*, il a démontré que l'OPN inhibe la calcification de la valve aortique.⁵⁸ L'OPN pourrait avoir un pouvoir

anti-calcifiant en stimulant la résorption. La liaison de l'OPN à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ des ostéoclastes entraîne une diminution du calcium cytosolique, ce qui est associé à une activation des ostéoclastes.⁵⁹

La balance entre l'ostéoprotégérine (OPG), RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa-B*) et RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B Ligand*) est fondamentale pour le mécanisme de calcification. L'OPG est une cytokine faisant partie de la superfamille des récepteurs du *tumor necrosis factor* (TNF), elle est sécrétée par les ostéoblastes et elle est un régulateur de la calcification. L'OPG inhibe la différenciation des macrophages en ostéoclastes et régule la résorption des ostéoclastes. L'OPG circule dans le sérum et est aussi un homologue de RANK pouvant se lier à RANKL.⁶⁰ RANKL est une cytokine essentielle pour la différenciation et l'activation des ostéoclastes. RANK est exprimé par les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les ostéoclastes.⁶¹⁻⁶³ La liaison entre RANK et RANKL stimule la cascade de signalisation intracellulaire menant à l'activation de NF- κ B (*Nuclear factor kappa beta*). Cette voie est un régulateur de la différenciation des ostéoclastes ainsi que de leur activation et entraîne une augmentation de la résorption du calcium de la part des ostéoclastes.⁶¹ RANKL a donc un rôle dans la stimulation de la résorption osseuse et l'OPG en se liant à RANKL, neutralise ce dernier et prévient la résorption du calcium. Il a été démontré que RANK est exprimé dans les valves normales, mais que son expression est diminuée dans les lésions de valves aortiques sténosées.⁵² Il a aussi été démontré que RANKL était en mesure de promouvoir la calcification des myofibroblastes de valves cardiaques.⁵²

Une balance hautement régulée existe entre RANKL et OPG qui contrôle la résorption et la formation de l'os. Le rôle de ces molécules est bien connu dans le métabolisme de l'os, mais leur rôle dans la calcification vasculaire est pour sa part moins bien élucidé. L'étude des effets de la délétion du gène de

l'OPG permet de mieux comprendre son rôle dans la calcification lié à des pathologies tel que l'athérosclérose et la SA. À l'âge d'un mois, les souris KO pour l'OPG souffrent d'une perte osseuse sévère et de plusieurs fractures ostéoporotiques.⁶⁴ Ce phénotype est caractérisé par une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes.⁶⁵ Par contre, la majorité des souris déficientes en OPG développent des calcifications au niveau des artères rénales et de l'aorte, ce qui entraîne la formation d'anévrismes, d'hémorragies et de ruptures des vaisseaux létales.⁶⁴

Les protéines morphogéniques osseuses (BMP – *bone morphogenetic proteins*) sont d'autres protéines impliquées dans la minéralisation osseuse normale ainsi que dans la calcification dans la SA. Les BMPs font donc partie des facteurs pro-calcifiants impliqués dans la physiopathologie de la SA. Il existe plusieurs protéines dans cette famille, qui appartient à la superfamille du facteur de croissance transformant (TGF – *transforming growth factor*), mais deux ont été mises particulièrement en cause dans la SA, la BMP2 et la BMP4. Ces protéines de la matrice osseuse extracellulaire sont de puissants morphogènes ostéogéniques, c'est-à-dire qu'ils régulent le développement de la calcification. La protéine BMP2 induit la formation osseuse en stimulant la différenciation ostéoblastique alors que BMP4 régule la formation osseuse.⁴⁷ Le TGF- β 1, joue aussi un rôle dans la calcification au niveau de l'athérosclérose et de la SA. Il s'agit d'une cytokine pléiotropique, dont il a été démontré qu'elle est responsable de promouvoir la calcification des cellules interstitielles de valves aortiques.⁶⁶ La production de BMP2 et BMP4 est assurée par les cellules endothéliales et est causée par le TNF- α , des peroxydes provenant d'un stress oxydatif et des forces de cisaillement, soit les forces de tensions sur les parois d'un vaisseau causées par l'afflux sanguin.^{67,68} En réponse à BMP2, il y a augmentation de l'expression d'ALP, qui permet la différenciation des ostéoblastes, les cellules responsables de la minéralisation.⁶⁹

La protéine MGP (*Matrix Gla protein* – Gla-protéine matricielle) peut pour sa part jouer un rôle dans la prévention de la calcification, puisque celle-ci peut se lier à BMP2 et ainsi inhiber l'induction de phosphatase alcaline (ALP – *alkaline phosphatase*).⁷⁰ La fonction de la MGP dépend de la gamma-carboxylation de ses résidus glutamates. Cette γ -carboxylation est pour sa part dépendante de la vitamine K et les résidus glutamates de la MGP lui confèrent sa grande affinité pour l'hydroxyapatite. Le processus de γ -carboxylation peut être inhibé par la warfarine, un antagoniste de la vitamine K.⁷¹ Des études chez la souris, ont permis de démontrer que chez les souris déficientes en MGP, il y a un développement de la calcification si important que celles-ci décèdent des suites d'une rupture de l'aorte.⁷² De plus, les souris déficientes en OPN et MGP ont une calcification qui est accélérée par rapport aux souris déficientes seulement pour la MGP, ce qui confirme que l'OPN empêche la calcification.⁷³

Les fibroblastes de la valve aortique peuvent aussi se différencier en myofibroblastes, des cellules dont le phénotype tend partiellement vers celui des cellules musculaires lisses. Certains de ces myofibroblastes possèdent un phénotype ostéoblastique et sont impliqués dans le développement des nodules de calcium.^{51,74} La transformation des fibroblastes en myofibroblastes s'expliquerait par la transdifférenciation, un type de métaplasie où une cellule qui n'est pas une cellule souche se transforme en un type différent de cellule.^{36,75} La transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes serait causée par les LDL oxydées ayant infiltrées la valve aortique.³⁶ De plus, il a été démontré *in vitro* que la formation de nodules de calcification par des myofibroblastes était plus importante lorsqu'ils étaient exposés à des lipides oxydés ainsi qu'au TGF- β 1.^{74,4,5} Cette infiltration de lipides entraîne le déclenchement d'une réponse inflammatoire ainsi que le recrutement de cellules inflammatoires au site de la lésion. Dans le cas de la SA,^{51,52,67-70}

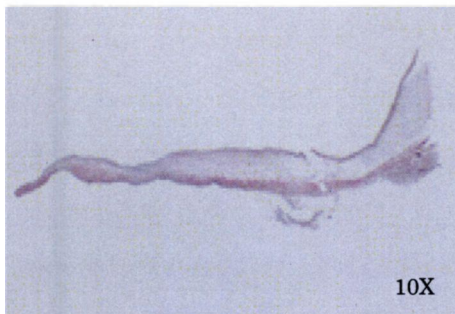
Parmi les cellules inflammatoires, qui infiltrent la valve aortique, il y a des macrophages, qui lorsqu'ils sont en présence de lipides, se transforment en cellules spumeuses, une cellule caractéristique de l'athérosclérose.^{2,58,73} Le processus de calcification nécessite aussi la participation de facteurs de transcription et la présence de l'un d'eux, Cbfa1, a été identifié à l'intérieur des valves humaines calcifiées.⁴⁷ Le processus de calcification ne peut être fonctionnel sans l'apport d'ALP, une enzyme qui permet de cliver les pyrophosphates inorganiques (PPi) en phosphates inorganiques (Pi) et permet ainsi la déposition de calcium.^{76,77} De plus, les lésions de valves aortiques qui présentent des nodules de calcification, contiennent de la ténascine-C, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire retrouvée habituellement dans les os en développement.^{78,61} Tous ces acteurs jouent un rôle prépondérant dans la calcification de la valve aortique sténosée. Pour qu'il y ait calcification, il faut une augmentation de l'expression des signaux favorisant l'ostéogénèse, mais il faut aussi une inactivation des inhibiteurs de la calcification. Certains facteurs cliniques d'initiation de la calcification ectopique dans l'athérosclérose et dans la SA ont maintenant été identifiés, c'est le cas pour l'hypercholestérolémie ainsi que pour l'hypertension.⁴⁷ Certains mécanismes liés à la calcification de la valve aortique en présence de SA demeurent encore mal expliqués, mais certains modèles animaux de la maladie permettent de mieux comprendre le phénomène.³⁶ La calcification n'apparaît donc pas comme étant un phénomène passif dû à la déposition de cristaux de calcium, mais bien un processus biologiquement régulé dont la finalité est la formation d'hydroxyapatite et sa déposition, un processus qui met en œuvre des cellules de type ostéoblastiques et ostéoclastiques ainsi que plusieurs protéines régulatrices.^{58,73}

2.2 Remodelage de la valve aortique

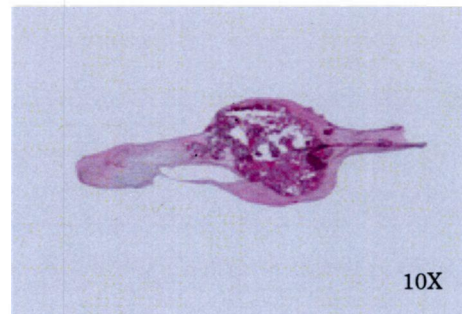
Le remodelage dans la SA se traduit par un épaissement la valve aortique qui est le résultat d'une fibrose interstitielle, de l'accumulation de dépôts de calcium ainsi que de l'infiltration de cellules inflammatoires. L'analyse microscopique des feuillets des valves sténosées permet de remarquer une hypertrophie de la fibrosa et de la spongiosa. Au niveau de la spongiosa, une augmentation de la densité cellulaire, qui comprend l'augmentation du nombre de fibroblastes, est aussi observée ainsi que la présence d'un excédent de collagène au travers de la matrice extracellulaire.⁷⁹ Suite au recrutement dans la valve aortique de cellules inflammatoires, il y a relâchement d'enzymes tel que les MMP (métalloprotéinase), qui entraînent la dégradation du collagène, de l'élastine ainsi que des protéoglycans.⁸⁰ Des cytokines, jouant un rôle dans le remodelage, sont aussi relâchées par les macrophages activés, les cellules T ainsi que par les fibroblastes eux-mêmes.⁸¹ L'une des cytokines produites par les cellules T, le TGF- β , est un activateur très puissant de la formation de matrice extracellulaire en raison de l'induction de la production de collagène et de l'inhibition de la dégradation protéolytique des constituants de la matrice extracellulaire.⁸² Tout comme le TGF- β , l'IL-1 est une cytokine qui stimule elle aussi la croissance du tissu conjonctif.⁸³ Un autre aspect du remodelage dans la SA est la présence de métaplasie cartilagineuse, c'est-à-dire la transformation de cellules interstitielles en cellules cartilagineuses.⁴⁸

La calcification et le remodelage de la valve sont étroitement liés. En effet, pour qu'il y ait déposition de calcium il faut l'action de MMP de la matrice, qui digèrent la matrice extracellulaire rendant ainsi possible la déposition de calcium. Les MMP peuvent coordonner la dégradation de tous les constituants de la matrice extracellulaire, comprenant le collagène.⁸⁴ Les MMP

sont impliquées dans le remodelage des tissus dans plusieurs maladies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde⁸⁵, l'anévrisme aortique⁸⁶ ainsi que dans l'athérosclérose.⁸⁷ Il existe plusieurs MMP, mais celles qui sont le plus en cause dans la SA sont la MMP-2 ainsi que la MMP-9. En effet, ces deux MMP peuvent dégrader la matrice extracellulaire ainsi que les constituants de la membrane basale.^{78,80,88} Dans la SA, les dépôts de calcium se forment justement aux endroits où la membrane basale a été perturbée.⁸⁹



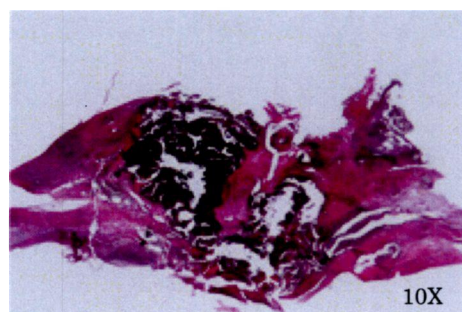
a) Feuille de valve aortique normale



c) Feuille de valve calcifiée, épaississement important, présence de calcifications, distorsion de la fibrosa.



b) Feuille de valve calcifiée. Épaississement modéré et présence de nodules précoces de calcification.



d) Feuille de valve calcifiée. Épaississement sévère, présence de plusieurs nodules de calcification, fibrose importante, destruction des fibres élastiques et de la plupart des composantes de la valve.

Figure 6: remodelage d'un feuillet de valve aortique

3. L'inflammation dans la sténose aortique

La SA a longtemps été considérée comme étant une maladie dégénérative due à l'usure des feuillets de la valve avec le temps. Depuis quelques années des études cliniques et fondamentales ont permis d'établir hors de tout doute que la SA est bel et bien une maladie s'apparentant à l'athérosclérose où la présence de lipoprotéines et l'inflammation font partie d'un processus actif qui mène à la calcification et à la dégénérescence des feuillets de la valve la rendant ainsi sténosante. Tel que dans l'athérosclérose, la SA se développe lentement pendant de nombreuses années avant de devenir un réel fardeau et une menace pour le patient qui en est atteint. De façon similaire à l'athérosclérose, le développement de la SA fait largement intervenir une inflammation chronique.

3.1 Cellules inflammatoires impliquées et leurs rôles

Les cellules inflammatoires observées dans les valves aortiques sténosées sont surtout des leucocytes. Les leucocytes comprennent plusieurs types cellulaires, mais les leucocytes qui jouent un rôle actif dans la SA sont les cellules T, les macrophages et les mastocytes, qui sont des cellules typiques de l'inflammation chronique.^{2,3,79,90}

3.1.1 Leucocytes

Au début des années 1990, des études sur les valves sténosées de patients souffrant de SA ont permis de découvrir que les feuillets de valves

aortiques étaient fortement infiltrés par des leucocytes. Les lésions, même précoces, au niveau des feuillets permettaient de constater la présence de ces cellules leucocytaires, signes d'une inflammation chronique. De plus, ces lésions et cette infiltration de cellules leucocytaires apparaissent aux endroits de la valve soumises à un stress mécanique plus grand, soit du côté aortique et non du côté ventriculaire.⁹¹ La présence de cellules inflammatoires étant aussi observée près des zones de calcification et d'infiltration lipidique, cela porte à croire que ces éléments sont liés ensemble en ce qui concerne l'initiation et la progression de la SA. Les cellules inflammatoires sont présentes autant dans les stades précoces qu'avancés des lésions des feuillets atteints de SA, et sont présentes autant dans les valves bicuspides que tricuspides.^{2,3,6} Le recrutement de ces cellules inflammatoires serait dû à une expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales. Ces molécules d'adhésion impliquées dans la SA sont au nombre de trois, soit la *E-selectin*, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) ainsi que ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*).⁹² Toutes ces molécules d'adhésion peuvent être produites non seulement par les cellules endothéliales et épithéliales, mais aussi par les leucocytes.⁹³ Ce phénomène a donc pour effet de maintenir l'état inflammatoire au niveau de la valve et d'entraîner le recrutement d'autres cellules inflammatoires.

3.1.2 Cellules T

Les cellules T sont recrutées au site de la lésion par les molécules d'adhésion et pénètrent l'espace sous-endothélial et la fibrosa. La plupart des cellules T se retrouvent près des zones de calcification ainsi que près des zones où se retrouvent de nouveaux vaisseaux, qui expriment du VEGF (*vascular endothelial growth factor*), les récepteurs de VEGF, ICAM-1 et VCAM-1.^{6,94} Les cellules retrouvées dans les valves de SA démontrent qu'elles sont dans un état

d'activation puisqu'elles produisent différents médiateurs inflammatoires tel que l'IFN- γ , le TGF- β 1, une cytokine importante dans le développement de la calcification, ainsi que l'interleukine-1 β (IL-1 β), une cytokine pro-inflammatoire qui a pour effet d'augmenter la production de MMPs.³ Le rôle de l'IFN- γ est controversé, puisque certaines études démontrent qu'*in vitro*, il est, un suppresseur puissant de l'ostéoclastogénèse.^{95,96} D'autres études *in vitro* démontrent que l'IFN- γ augmente la production des ostéoclastes dans certaines cultures.⁹⁷ Les effets de l'IFN- γ *in vivo* sont tout aussi controversés. Lorsque la signalisation via le récepteur de l'IFN- γ est empêchée il y a déclenchement de résorption osseuse.⁹⁸ Chez les souris nues, l'IFN- γ diminue le calcium sérique et la résorption osseuse par les ostéoclastes.⁹⁹ Par contre, chez les humains et les rongeurs, l'IFN- γ augmente la résorption osseuse et entraîne la perte osseuse dans plusieurs pathologies.^{100,101} Enfin, chez les souris KO pour le gène de l'apoE, qui fait en sorte qu'elles développent de l'athérosclérose, l'IFN- γ intensifie la maladie.¹⁰² Il apparaît donc que plus de recherches soient nécessaire pour bien comprendre le rôle de l'IFN- γ . Enfin, la présence de cellules T contribue donc, non seulement à la calcification, mais aussi à la production de matrice extracellulaire ainsi qu'au remodelage de la valve.^{66,103}

3.1.3 Macrophages

Les macrophages dans la circulation sont appelés des monocytes, ces cellules sont recrutées au site de la lésion par les mêmes molécules d'adhésion que les cellules T. Lors de leur entrée dans l'endothélium, les monocytes subissent une transformation et se différencient alors en macrophages.⁹² Les macrophages sont des phagocytes et lorsqu'ils sont à l'intérieur de la valve, ils peuvent internaliser une grande quantité de lipides présents, ce qui entraîne leur transformation en cellules spumeuses. Ce phénomène, soit la présence de

cellules spumeuses, est une des marques distinctives de l'athérosclérose.¹⁰⁴ Les macrophages tout comme les cellules T entraînent la poursuite du cycle de l'inflammation, qui devient alors chronique. Les macrophages sont responsables de la production de TNF- α , une cytokine inflammatoire qui joue un rôle important dans l'inflammation, la calcification et le remodelage de la valve sténosée.^{84,105} Les macrophages sont aussi impliqués dans la calcification de la valve aortique en produisant entre autres de l'OPN, une protéine importante dans la déposition de l'hydroxyapatite.

3.1.4 Mastocytes

Les mastocytes sont des cellules du système immunitaire retrouvées dans la plupart des tissus mais principalement dans le tissu conjonctif lâche. Les mastocytes contiennent des granules qui sont remplies de plusieurs médiateurs tel que l'histamine et l'héparine. Le rôle joué par les mastocytes dans les réactions allergiques est bien connu, mais les mastocytes sont aussi impliqués dans la réparation tissulaire, dans la protection contre les pathogènes ainsi que dans de nombreux processus inflammatoires de même que dans le métabolisme des lipoprotéines.¹⁰⁶ Les mastocytes sont impliqués dans la SA pour plusieurs raisons. En effet, les produits relâchés lors de la dégranulation des mastocytes activés peuvent prendre différentes formes et avoir des effets différents dans la pathologie. La dégranulation ou l'activation des mastocytes peut être induite par des facteurs solubles produits par plusieurs types cellulaires tel que les macrophages.¹⁰⁷

Parmi les produits relâchés par les mastocytes, lors de leur dégranulation il y a la chymase, une protéase qui joue un rôle clé dans le système rénine-angiotensine et dont l'expression est augmentée dans la SA.⁹⁰ La chymase est l'une des enzymes permettant de transformer l'angiotensine I

en angiotensine II (AngII). L'Ang II est un puissant médiateur pro-inflammatoire et pro-fibrotique. Une augmentation de la production d'Ang II pourrait, par la stimulation de la production de TGF- β 1, entraîner la transcription du gène du collagène et ainsi faire en sorte qu'il y ait une augmentation de la production de collagène¹⁰⁸, un phénomène lié de manière importante au remodelage de la valve aortique dans la SA.⁷⁹ L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE – *angiotensin converting enzyme*), une autre enzyme liée au système rénine-angiotensine, mais qui n'est pas produite par les mastocytes, mène elle aussi à la production d'Ang II. L'ACE est elle aussi produite davantage dans les cas de SA.¹⁰⁹

Une autre protéase dérivée des mastocytes pourrait elle aussi jouer un rôle dans la SA. En effet, Helske et al. ont démontré que la cathepsine G, qui peut elle aussi transformer l'angiotensine I en Ang II et qui possède une puissante activité élastolytique, pourrait jouer un rôle dans le remodelage de la valve aortique dans la SA. La cathepsin G est retrouvée dans les valves normales, mais son expression est fortement augmentée dans les valves de sténose aortique. Cette étude a aussi démontré que la cathepsine G provient en majeure partie des mastocytes activés.¹¹⁰ La cathepsine G pourrait donc augmenter davantage la production d'Ang II. L'Ang II en se liant aux récepteurs AT-1, qui sont exprimés par les fibroblastes dans la SA^{9,90}, aurait pour effet d'augmenter l'expression de TGF- β 1, qui joue un rôle important dans le remodelage en étant responsable de la formation du tissu conjonctif et de la synthèse du collagène.¹⁰⁸ Non seulement le TGF- β 1 produit suite au relâchement de cathepsine G a un effet fibrotique, mais sa présence pourrait aussi contribuer à la progression de la SA en initiant le processus de calcification dans la valve.⁶⁶ Enfin, le remodelage de la valve implique aussi la destruction des fibres élastiques et il a été découvert que dans les valves de SA, les endroits où une activité élastolytique importante avait lieu, étaient aussi

ceux correspondant à une expression plus élevée de cathepsine G produite par des mastocytes.¹¹⁰

Des études *in vitro* ont aussi permis de démontrer que les produits solubles relâchés par les mastocytes étaient en mesure de stimuler les fibroblastes à produire de la collagénase¹¹¹ et les monocytes/macrophages à produire davantage d'IL-1, une cytokine reconnue pour stimuler les cellules du tissu conjonctif à produire des MMP.¹¹² Enfin, les mastocytes sont également en mesure de relâcher du TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle important dans la régulation de l'expression d'IL-1 et dans la dégradation de la matrice via, entre autres, la stimulation de MMPs.¹¹³

3.2 Marqueurs inflammatoires et leurs rôles

Les marqueurs inflammatoires, qui sont principalement des cytokines, jouent plusieurs rôles en ce qui a trait à la progression de la SA. Ils sont impliqués au niveau du recrutement de cellules inflammatoires et du maintien de l'état inflammatoire. Ils jouent aussi un rôle dans la prolifération cellulaire, ce qui entraîne de la fibrose et du remodelage au niveau de la valve et stimulent les processus de la calcification.

3.2.1 Tumor Necrosis Factor

Le TNF- α est une cytokine inflammatoire jouant un rôle prépondérant dans l'inflammation. Dans la SA, le TNF- α est exprimé par les macrophages recrutés à l'intérieur des feuillets.¹⁰⁵ L'activation des macrophages nécessaires

à la production de TNF- α peut provenir de LDL oxydées (ox-LDL) ou encore de dommages à la matrice extracellulaire.^{114,115} Le TNF- α joue aussi un rôle dans le remodelage de la valve aortique puisqu'il a été démontré qu'il pouvait stimuler l'expression de MMP.^{84,116,117} Des études, avec des cultures de myofibroblastes de valve aortique humaine, ont permis de découvrir que leur incubation en présence de TNF- α induisait la production de MMP-1, une MMP impliquée dans le remodelage de la valve aortique. La production de MMP-1 a aussi été observée dans les valves aortiques et la présence de MMP-1 était localisée aux endroits où des leucocytes exprimaient du TNF- α .¹⁰⁵ Le TNF- α joue aussi un rôle dans la calcification en tant que pro-calcifiant. Le TNF- α entraîne les myofibroblastes de valve aortique humaine à adopter un phénotype qui s'apparente aux ostéoblastes.¹¹⁸

3.2.2 Protéine C-réactive

La protéine C-réactive (CRP) a été découverte durant les années 1930 dans le sérum d'un patient suite à une pneumonie aiguë due à un pneumocoque.¹¹⁹ Elle est produite par les hépatocytes en réponse à des cytokines pro-inflammatoires, telle l'interleukine-6 (IL-6). Les protéines de phases aiguës s'élèvent lorsqu'il y a inflammation, et la CRP a été la première protéine de phase aiguë identifiée. Des traces de CRP peuvent être retrouvés dans le plasma normal. En effet, on retrouve entre 0,3 à 1,7 mg/litre dans le plasma et les personnes en santé n'ont pas plus de 3 mg/litre de CRP plasmatique. Dès que ce niveau est dépassé la situation est jugée comme étant anormale.¹²⁰ Dans les 24 à 48 heures suivant le début d'une réponse de phase aiguë, les niveaux de CRP augmentent rapidement jusqu'à atteindre des valeurs de 300 mg/litre. Lorsque les stimuli inflammatoires disparaissent, il y a rapidement un retour de la CRP à des valeurs normales.

Des études réalisées sur la CRP dans la SA ont révélé que le niveau de ce marqueur inflammatoire est bel et bien augmenté chez les patients souffrant de SA par rapport à des patients en santé en guise de contrôles.¹²¹⁻¹²³ Par contre, dans une étude, malgré l'augmentation du taux de CRP chez les patients souffrant de SA, il n'a pas été possible de trouver d'associations entre la CRP et la vélocité du jet aortique, l'aire valvulaire aortique ou encore avec le degré de calcification.¹²¹ Il a aussi été démontré que la CRP atteint un niveau élevé dans le sérum des patients souffrant de SA asymptomatiques, mais ces études n'ont pu démontrer que l'augmentation des niveaux de CRP se faisait en conformité avec l'augmentation de la sévérité de la maladie.¹²² Dans une autre étude sur la CRP, il a été démontré que les niveaux de CRP plasmatiques pourraient prédire la progression de la SA. En effet, selon l'étude AORTICA, les patients avec une progression rapide de la maladie avaient des taux de CRP significativement plus élevés que les patients dont la progression de la maladie était lente.¹²³ Des études tendent à démontrer que la CRP pourrait aussi jouer un rôle direct dans le développement de l'état inflammatoire et qu'elle pourrait avoir un effet pro-athérogène sur les cellules vasculaires en augmentant leur expression de la protéine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*).¹²⁴ MCP-1 est une protéine qui a pour effet de recruter les monocytes vers l'endothélium, et d'induire la production des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et E-selectine.¹²⁵

4. Sténose aortique et désordres métaboliques

Parmi les désordres métaboliques, il y a les dyslipidémies, qui sont des anomalies qualitatives ou quantitatives des lipides sanguins, dont l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie. Le cholestérol lié au LDL (LDL-C) est maintenant bien établi comme étant un facteur de risque de

maladies cardiovasculaires. Le LDL-C est d'ailleurs reconnu comme étant une cible importante dans la prévention des maladies cardiovasculaires, et ce autant en prévention primaire que secondaire.¹²⁶ L'obésité et le diabète ainsi que la myriade de désordres métaboliques qui y sont associés sont en augmentation et prennent des proportions inquiétantes dans tous les pays industrialisés des Amériques, de l'Europe et du monde entier. Il apparaît maintenant clair, que les désordres métaboliques, prennent une part importante dans l'initiation et la progression des maladies cardiovasculaires, et ce bien au-delà du LDL-C. À cet effet, plusieurs études démontrent l'importance du HDL-C¹²⁷, de la taille des particules de lipoprotéines¹²⁸ ainsi que des lipides oxydés dans les maladies cardiovasculaires.¹²⁹⁻¹³⁷ Des études ont aussi démontrées que les désordres métaboliques sont en lien avec l'initiation, la progression et la sévérité de la SA.^{4,5}

L'utilisation de statines s'est avérée être un traitement de choix pour abaisser les taux de LDL-C, un facteur de risque important des maladies cardiovasculaires.¹³⁸ Malheureusement, à ce jour ce traitement ne s'est pas révélé être en mesure de ralentir ou stopper la progression de la SA. De plus, dans le cas de la SA, la plupart des patients suivis sont déjà sous traitement avec une statine et beaucoup de ces patients possèdent des taux de LDL-C considérés comme étant normaux. Il apparaît donc que la physiopathologie de la SA, autant au point de vue de son initiation que de sa progression, va bien au-delà du LDL-C. Il est donc primordial d'identifier et d'étudier les facteurs métaboliques pro-athérogéniques qui pourraient jouer un rôle dans l'initiation et la progression de la SA. Les désordres métaboliques liés à l'obésité, principalement à l'obésité viscérale, sont souvent pointés du doigt dans les maladies cardiovasculaires.¹³⁹ L'obésité, ainsi que les désordres métaboliques en découlant, sont responsables de maintenir dans l'organisme un état inflammatoire délétère. De plus, le tissu adipeux produit une quantité

importante de médiateurs inflammatoires pouvant avoir un impact entre autres sur la physiopathologie de la SA. L'étude des désordres métaboliques est donc capital, et pourrait permettre éventuellement de trouver un moyen de traiter médicalement la SA.

Il est maintenant reconnu que les facteurs de risque cardiovasculaire ont un effet synergique¹²⁷ et l'un des désordres métaboliques souvent mis en cause dans les maladies cardiovasculaires est le syndrome métabolique (SM), qui est caractérisé par la présence d'un groupe de facteurs de risque chez un individu. Ces facteurs de risque sont présentés dans le tableau 2. Dans une étude publiée par Briand et al. il a été démontré que le syndrome métabolique est un prédicteur puissant et indépendant de la progression de la SA et d'évènements cliniques chez ces patients. Fait intéressant, malgré le fait que le traitement avec une statine a permis d'atteindre les niveaux recommandés par le NCEP-ATPIII, soit un taux de LDL-C <100 mg/dl (2,6 mmol/L), chez tous les patients avec un SM, la progression était tout de même deux fois plus rapide en comparaison avec les patients sans SM.¹⁴⁰ Parmi les conditions associées au SM, il y a la sédentarité, le vieillissement, les déséquilibres hormonaux ainsi que la prédisposition génétique. Aux Etats-Unis seulement, le nombre de personnes atteintes du SM est estimé à plus de 50 millions. Enfin, des études menées sur l'impact des statines et des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ont démontré peu ou pas d'effets sur les perturbations métaboliques associées au SM.^{141,142}

Tableau 2 : caractéristiques du syndrome métabolique

▪ Obésité abdominale (abondant tissu adipeux au niveau de l'abdomen)
▪ Dyslipidémie athérogène (désordres des lipides sanguins – triglycérides élevés, LDL-C élevé, HDL-C bas)
▪ Pression sanguine élevée
▪ Résistance à l'insuline ou intolérance au glucose
▪ État pro-thrombotique (e.g. fibrinogène élevé ou présence de l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène dans le sang)
▪ État pro-inflammatoire (e.g. CRP élevée dans le sang)

Tableau 3: critères de diagnostique du SM selon le NCEP-ATPIII modifiés selon l'American Heart Association

	Homme	Femme
Tour de taille élevé	≥ 102 cm	≥ 88 cm
Triglycérides élevés	≥ 1,7 mmol/L	≥ 1,7 mmol/L
HDL-C bas	≤ 1,03 mmol/L	≤ 1,29 mmol/L
Pression sanguine élevée	≥ 130/85 mm Hg	≥ 130/85 mm Hg
Glycémie à jeun élevée	≥ 5,6 mmol/L	≥ 5,6 mmol/L

4.1 Troubles lipidiques, rôles et importance dans la sténose aortique

Tout comme dans l'athérosclérose, les lipides sont maintenant pointés du doigt pour leur rôle dans la SA. En effet, les études ont démontré que les LDL seraient responsables de l'initiation des plaques d'athéromes ainsi que des

premières lésions menant à la SA. Des lésions au niveau de l'endothélium, ainsi qu'un stress hémodynamique important, permettent aux lipides, dont les LDL, de pénétrer l'endothélium.⁴ Loin du sérum sanguin, qui est rempli d'antioxydants, les LDL sont alors sujets à l'oxydation.⁵ Cette oxydation est le signal de départ d'une réponse inflammatoire^{143,144}, qui évolue rapidement vers le stade chronique. Les macrophages recrutés au site de la lésion internalisent ces LDL oxydés et deviennent des cellules spumeuses,⁵ qui entretiennent une inflammation chronique contribuant ainsi à la progression de la maladie. Les lipides oxydés jouent aussi un rôle prépondérant dans l'induction du processus de remodelage et de calcification.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷

4.1.1 LDL et LDL-cholestérol

Le LDL est l'une des lipoprotéines du sérum sanguin, elle est formée par le foie et les intestins et elle est très riche en cholestérol. Il s'agit de la lipoprotéine mise en cause dans la formation des dépôts de cholestérol impliqués dans la formation des plaques athéromateuses. C'est en raison de son implication dans les maladies cardiovasculaires que le cholestérol associé à cette lipoprotéine est considéré comme étant le « mauvais cholestérol ». Le rôle des lipoprotéines est de transporter les lipides dans le sérum, qui est un milieu aqueux. Le LDL transporte donc le cholestérol et les triglycérides (TG) de la circulation, du foie vers les tissus périphériques et les cellules. Le cholestérol est essentiel à l'organisme puisqu'il est un des constituants des membranes cellulaires ainsi que de différentes hormones, dont les hormones sexuelles (œstrogène et testostérone). Le cholestérol est synthétisé à partir de l'acétyl-CoA via la voie de l'HMG-CoA réductase. Cette voie est celle ciblée par les statines, les médicaments prescrits dans le but de réduire les niveaux de cholestérol. Le cholestérol est donc nécessaire et les cellules qui en ont besoin

peuvent se lier aux LDL via l'expression du récepteur des LDL (LDLr) pour combler leurs besoins. Chaque particule de LDL possède une apolipoprotéine B100 (Apo-B100), qui sert de ligand au LDLr. La taille des particules de LDL varie généralement entre 225 et 275 Å.

Il a été démontré que des particules de LDL sont présentes dans les lésions précoces de la valve aortique⁴ et que ces particules sont soumises à une oxydation.⁵ Une autre particule a elle aussi été retrouvée dans les lésions de valve aortique, il s'agit de la lipoprotéine a (Lp(a)), une lipoprotéine sécrétée par le foie dont la composition lipidique est semblable à celle des LDL, mais qui comporte une apolipoprotéine anormale (A-protéine) en plus de l'apo-B100. La Lp(a) est considérée comme étant très athérogène et thrombogène.⁴

Le dépôt des particules de LDL dans l'endothélium, autant dans l'athérosclérose que dans la SA, s'expliquerait par le fait que ces particules réagissent avec les protéoglycanes de la matrice extracellulaire. Les protéoglycanes sont formés d'une protéine centrale à laquelle sont attachés une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes.¹⁴⁸ En effet, les lipoprotéines peuvent se lier aux protéoglycanes via des interactions charge-charge entre les acides aminés basiques des apolipoprotéines, qui sont chargés positivement, et les chaînes de glycosaminoglycanes des protéoglycanes qui sont chargées négativement.¹⁴⁹

4.1.1.1 Particules de LDL petites et denses

Récemment, il est apparu que la problématique avec le LDL-C et les LDL n'est pas seulement au niveau de la quantité de LDL-C ou du nombre de particules de LDL. Des études ont permis de mettre en lumière l'importance de

la taille et de la densité des particules de LDL dans les processus athérosclérotiques. En effet, lorsque les particules de LDL sont petites et denses, il est plus facile pour ces particules de pénétrer l'endothélium et elles sont aussi plus fragiles à l'oxydation.^{150,151} L'origine des particules de LDL petites et denses n'est pas tout à fait élucidée. Par contre, cela pourrait s'expliquer par le fait que l'échange de TG et d'esters de cholestérol entre les *very low-density lipoproteins* (VLDL) et les LDL entraîne la formation de particules de LDL enrichies en TG et suite à la lipolyse, ces particules devenant alors plus petites et plus denses.¹⁵² Ce phénotype de particules petites et denses est le plus souvent observé chez les individus touchés par de l'obésité viscérale et un SM.

4.1.2 Particules de LDL oxydées

Les lipides circulants dans le sang sont protégés de l'oxydation car le sang contient naturellement des antioxydants. Par contre, lorsque les LDL pénètrent l'endothélium et se lient aux protéoglycanes, ils sont alors sujets à l'oxydation.¹⁰⁴ Certaines molécules qui se retrouvent alors en présence des LDL possèdent des électrons libres, parmi ceux-ci il y a des radicaux libres, de l'oxyde nitrique ainsi que des ions métalliques de fer ou de cuivre. La peroxydation lipidique, cette interaction entre les molécules possédant des électrons libres et les lipides, fait en sorte que des électrons sont arrachés aux lipides ce qui les endommage et les modifie.¹⁵³ À l'origine, les particules de LDL sont formées entre autres d'une Apo-B100, de phospholipides et elles sont enrichies en antioxydants et en acides gras polyinsaturés (PUFA – *polyunsaturated fatty acids*). Lorsque l'oxydation débute, celle-ci affecte seulement les phospholipides à la surface des LDL, les particules sont alors considérées comme étant faiblement modifiées (mmLDL – *minimally modified*

LDL).¹⁵⁴ Les particules de mmLDL possèdent toujours une Apo-B100 intacte, mais ont perdu des PUFA ainsi que des antioxydants. Étant donné que les mmLDL ont leur Apo-B100, ces particules sont encore reconnues par le LDLr.¹⁵⁵ Les particules de mmLDL sont en mesure d'induire les cellules endothéliales à exprimer la MCP-1¹⁵⁶, qui a pour rôle d'initier le recrutement des monocytes au site de son expression, ainsi que le M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), qui permet la différenciation des monocytes en macrophages.¹⁵⁷

Les particules de LDL subissent davantage les effets de l'oxydation et c'est alors l'Apo-B100 qui est modifiée. Les particules d'ox-LDL sont alors davantage chargées négativement et étant donné que l'Apo-B100 est modifiée, il en résulte une affinité moins grande pour le LDLr, mais une très grande affinité pour les récepteurs scavengers (*scavenger receptors*).¹⁵⁸ Les ox-LDL sont alors en mesure d'activer les cellules endothéliales pour qu'elles expriment les molécules d'adhésion comme VCAM-1 et ICAM-1, ce qui permet l'entrée des monocytes dans l'endothélium.^{159,160} Suite à leur différenciation, les macrophages qui expriment des récepteurs scavengers à leur surface, internalisent les ox-LDL. Étant donné qu'aucune rétroaction ne permet l'inhibition de cette internalisation, les macrophages accumulent sans cesse ces lipides, ce qui les transforme en cellules spumeuses.¹⁰⁴ Les macrophages et les cellules spumeuses produisent alors des cytokines pro-inflammatoires qui entraînent le recrutement d'autres monocytes et la formation de nouvelles cellules spumeuses, débute alors le cercle vicieux de la maladie athérosclérotique.

Le recrutement de cellules inflammatoires ainsi que le relâchement de cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF- α , déclenche le développement d'un phénotype cellulaire de type ostéoblastique. Ces cellules sont alors en mesure de produire une matrice calcifiée. Les cellules inflammatoires produisent aussi

des cytokines qui seront responsables du remodelage de la valve par la destruction des composantes des feuillets de la valve tel que les fibres élastiques et le collagène. Le remodelage sera aussi causé par la production de matrice extracellulaire et de cartilage. Le remodelage ainsi que la calcification de la valve sont les deux facteurs directement liés à la perte de mobilité et au durcissement des feuillets de la valve. Les ox-LDL sont retrouvés dans la valve aortique aux endroits où sont situés les infiltrats de cellules inflammatoires et les nodules de calcification. Les lipides et leur oxydation sont donc au cœur de l'initiation et du développement de la SA. Un schéma représentant un mécanisme potentiel menant au remodelage et à la calcification des feuillets de la valve aortique serait causé par l'infiltration lipidique et représenté à la figure 7.

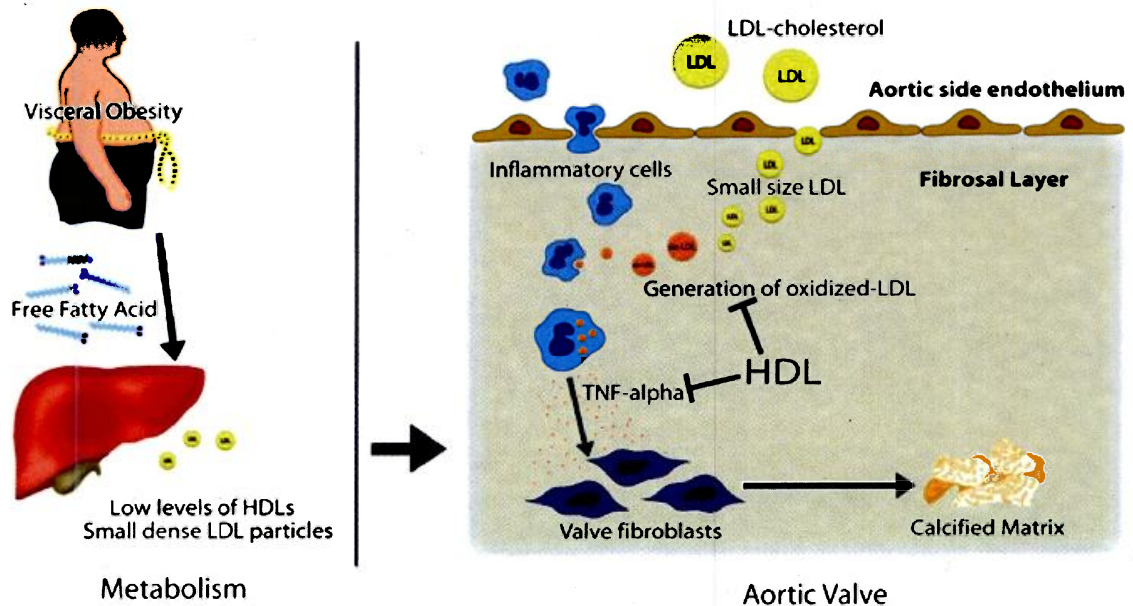


Figure 7 : mécanismes potentiels d'initiation et de développement de la SA.

4.1.3 LDL oxydées plasmatiques

Malgré le fait que le sang ne soit pas un endroit de prédilection pour l'oxydation des lipides, étant donné qu'il contient plusieurs antioxydants, la présence d'ox-LDL dans la circulation sanguine est tout de même constatée. Des études ont permis de démontrer qu'il existe une corrélation positive entre le niveau d'ox-LDL circulantes et la présence de maladies cardiovasculaires, que ce soit au niveau de l'épaisseur de la média et de l'intima (*intima media thickness*), un indicateur de l'étendue de la maladie athérosclérotique, ou au niveau de la présence de plaques athéromateuses dans les vaisseaux.^{161,162} Des études ont évalué les niveaux d'ox-LDL plasmatiques en tant que marqueurs de risques cardiovasculaires. Plusieurs études cas-contrôle ont permis de découvrir que les patients avec maladies cardiovasculaires ou encore les patients avec un risque élevé de développer une maladie cardiovasculaire avaient des taux élevés d'ox-LDL plasmatiques.^{130,131,133-135,137} La mesure des ox-LDL plasmatiques pourraient donc être une valeur additionnelle dans l'établissement du risque cardiovasculaire.¹³¹

Pour expliquer la présence d'ox-LDL dans le plasma, il a été suggéré que ces particules pourraient provenir de l'endothélium des vaisseaux et pourraient être relâché dans la circulation suite à des ruptures de petites plaques d'athéromes contenant ces lipides oxydés.¹⁶³ La concentration plasmatique en ox-LDL peut être déterminée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui peuvent être dirigés contre des structures des LDL modifiées par l'oxydation.^{163,164} Les taux élevés d'ox-LDL plasmatiques ainsi mesurés sont en corrélation avec la vulnérabilité à la rupture des lésions athéromateuses¹⁶⁵ ainsi qu'avec la quantité d'ox-LDL retrouvée à l'intérieur des plaques au niveau des coronaires.¹⁶⁶ Les ox-LDL plasmatiques ne seraient toutefois pas seulement un marqueur de maladies cardiovasculaires, mais pourraient aussi avoir un

rôle à jouer dans leur pathogénèse. En effet, il a été démontré que les ox-LDL plasmatiques seraient biologiquement actives puisque les niveaux élevés de ox-LDL dans le plasma seraient liés à l'activation de l'inflammation chez les leucocytes circulants.¹⁶⁷

4.1.4 HDL

Les HDL (*high-density lipoprotein*) sont des lipoprotéines de haute densité, dont l'un des rôles est de transporter le cholestérol des tissus vers le foie, pour qu'il soit excrété dans la bile.¹⁶⁸ Il s'agit des plus petites lipoprotéines, mesurant entre 75 et 100 Å, et environ la moitié des particules de HDL sont composées de protéines, ce qui explique qu'elles soient les lipoprotéines les plus denses. Les HDL ont des propriétés anti-athérogènes et c'est pour cette raison que contrairement au LDL, elles sont qualifiées de « bon cholestérol ». Leurs actions bénéfiques ne s'expliquent pas seulement par le transport inverse du cholestérol vers le foie, il a en effet été démontré que les particules de HDL possèdent une activité anti-oxydante, anti-inflammatoire et qu'elles peuvent même protéger les LDL de l'oxydation.

Les particules de HDL sont associées à une enzyme, la paraoxonase, qui participe aux rôles joués par cette lipoprotéine. La paraoxonase (PON) est une famille composée de trois enzymes (PON1, 2 et 3), dont PON1 est la plus étudiée. PON1 est sécrétée par le foie dans la circulation sanguine et s'associe ensuite aux particules de HDL. Elle est impliquée dans certaines des activités anti-athérogènes des HDL. Malgré le fait que le rôle de PON1 *in vivo* ne soit pas entièrement clarifié, des études *in vitro* ont démontré que l'ajout de PON1 purifié a l'effet d'inhiber l'accumulation de lipides peroxydés dans les LDL, cette enzyme joue donc vraisemblablement un rôle dans l'atténuation de

l'oxydation des LDL.¹⁶⁹ Des études *in vitro* et impliquant des modèles animaux ont aussi permis de découvrir que les PON peuvent protéger les particules de HDL de l'oxydation et permettent aussi de préserver leur intégrité.^{170,171} Un fait intéressant, qui renforce le rôle anti-athérogène des HDL, provient d'une étude sur les souris déficientes en PON1, qui sont davantage susceptibles de développer de l'athérosclérose que les souris *wild-type* lorsque ces souris sont soumises à une diète élevée en gras et en cholestérol.¹⁷²

L'aspect anti-inflammatoire des particules de HDL serait pour sa part assuré en partie par l'apolipoprotéine A-1 (ApoA-1). L'apoA-1 est l'apolipoprotéine majeure des particules de HDL et joue un rôle important dans le transport inverse du cholestérol. L'ApoA-1 permet l'efflux de cholestérol, c'est-à-dire le transfert du cholestérol provenant des cellules vers les particules de HDL. De plus, les particules de HDL permettent de diminuer la production de TNF- α et d'IL-1 β par les monocytes lorsque ces derniers sont activés par les cellules T.^{173,174} Ceci a aussi un impact sur la calcification puisque le TNF- α a été démontré comme étant un des instigateurs du changement phénotypique des cellules vasculaires en cellules de types ostéoblastiques.¹⁷⁵ Les particules de HDL exercent leur action anti-inflammatoire en inhibant l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et induite par la présence de cytokines telles que l'IL-1 et le TNF- α .¹⁷⁶ Des études cliniques ont démontré que, dans les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques, les concentrations de HDL sont souvent en corrélation négative par rapport aux cytokines pro-inflammatoires et la CRP.^{177,178} Il a aussi été démontré dans une étude sur des cellules endothéliales provenant de veines ombilicales, que les particules de HDL étaient en mesure d'inhiber l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion induite par la CRP,¹⁷⁹ prouvant une fois de plus le caractère anti-inflammatoire des particules de HDL.

Hypothèses

Il apparaît maintenant que les ox-LDL pourraient jouer un rôle dans l'initiation et le développement de la SA. Les LDL, particulièrement celles qui sont petites et denses, donc plus athérogènes, pénètrent l'endothélium des feuillets de la valve plus facilement. Ces LDL sont alors oxydées et entraînent le recrutement de cellules inflammatoires. Il se crée alors un état inflammatoire chronique dans la valve qui mène ultimement au remodelage et à la calcification des feuillets de la valve. Le remodelage fibro-calcifique de la valve entraîne la sténose de la valve, qui se traduit par la diminution de l'aire valvulaire ainsi que par la présence d'un gradient trans-valvulaire. Si la SA devient sévère, le seul traitement possible pour traiter le patient sera de procéder à un RVA. L'une des difficultés dans le suivi de traitement est d'identifier les patients qui verront leur maladie devenir sévère. Il est donc important d'identifier les facteurs menant au développement de la SA, d'identifier les mécanismes et les voies de signalisation impliquées ainsi que les marqueurs permettant de cibler les patients plus à risque de voir leur maladie évoluer rapidement.

Étant donné l'importance apparente des ox-LDL dans la SA, il est possible que leurs niveaux plasmatiques puissent fournir des indications sur l'état de la maladie. Des taux élevés d'ox-LDL plasmatiques se sont révélés être un marqueur de risque de maladies coronariennes. Ces taux se sont aussi montrés être un marqueur de risque d'événements coronariens. Notre hypothèse de recherche est donc que le remodelage de la valve est un facteur important

déterminant la sévérité de la SA et que les taux d'ox-LDL plasmatiques sont associés avec le remodelage fibro-calcifique de la valve aortique.

Si tel est le cas, les taux d'ox-LDL plasmatiques pourraient servir de marqueur de la sévérité de la SA. Cela pourrait ainsi permettre d'identifier les patients chez qui un remodelage fibro-calcifique plus avancé pourrait être en lien avec une maladie plus sévère.

Cette hypothèse a été testée et notre étude à mené à la publication d'un article dans la revue *Heart*.

Chapitre 2

Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and fibro-calcific remodeling of the aortic valve in aortic stenosis.

2.1 Résumé

ASSOCIATION ENTRE LES LIPOPROTÉINES DE BASSES DENSITÉ OXYDÉES ET LE REMODELAGE FIBRO-CALCIFIQUE DE LA VALVE AORTIQUE DANS LA STÉNOSE AORTIQUE.

Introduction : La sténose aortique (SA) est la maladie valvulaire la plus répandue dans les pays occidentaux. La SA est une maladie qui s'apparente à l'athérosclérose où la calcification et le remodelage tissulaire jouent un rôle crucial. Chez des patients atteints d'une SA modérée à sévère, nous avons cherché à déterminer si le processus de remodelage pourrait être en relation avec le gradient trans-valvulaire ainsi qu'avec les taux circulants de lipoprotéines de basses densités oxydées (ox-LDL).

Méthodes : Chez 105 patients avec SA, la valve aortique a été explantée au moment de la chirurgie. Un échantillon de plasma sanguin a aussi été recueilli afin de déterminer le profil lipidique incluant la taille des particules LDL ainsi que les niveaux circulants d'ox-LDL (anticorps 4E6). Les valves ont été analysées pour mesurer le processus de remodelage en établissant le degré de remodelage selon une échelle de 1 à 4. La quantité de calcium dans la valve a aussi été mesurée.

Résultats : Après ajustement pour les co-variables, le degré de remodelage aortique était en lien de façon significative avec les gradients trans-valvulaires hémodynamiques tel que mesurés par échocardiographie Doppler . Les patients avec un degré de remodelage de la valve plus élevé avaient aussi des taux plus élevés de ox-LDL circulantes. Les niveaux d'ox-LDL circulantes étaient de 27,3

$\pm 2,6$ U/L, $32,2 \pm 2,3$ U/L et de $38,3 \pm 2,3$ pour les patients dont le degré de remodelage respectif était de 2, 3 et 4 ($p=0,02$). Après correction pour l'âge, le sexe, l'hypertension et le HDL-C, le niveau d'ox-LDL plasmatique est demeuré associé de manière significative avec le degré de remodelage de la valve aortique ($p=0,0009$). Les niveaux plasmatiques d'ox-LDL étaient associés de manière significative avec le LDL-C ($r=0,23$; $p<0,0001$), l'apoB ($r=0,59$; $p<0,0001$), les triglycérides ($r=0,39$; $p<0,0001$), l'apoA-1 ($r=0,23$; $p=0,01$) ainsi qu'avec le cholestérol associé aux petites particules de LDL (LDL-C_{<255Å}) ($r=0,22$; $p=0,02$). Après correction pour les co-variables, les niveaux circulants d'ox-LDL sont demeurés associés de manière significative avec les niveaux d'apoB ($p=0,0003$) ainsi qu'avec les niveaux de triglycérides ($p=0,01$).

Conclusion : Les niveaux d'ox-LDL circulantes sont associés à davantage de remodelage fibro-calcifique du tissu valvulaire dans la SA. Il reste à déterminer si les ox-LDL circulantes sont un marqueur de risque pour un profil hautement athérogène et/ou s'il s'agit de molécules activement impliquées dans la pathogénèse dans la maladie valvulaire aortique calcifiée.

2.2 Title page

Title : Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and fibro-calcific remodeling of the aortic valve in aortic stenosis.

Authors: Côté Claude, BSc¹; Pibarot Philippe, DVM, PhD²; Després Jean-Pierre, PhD³; Mohty Dania, MD¹; Cartier Amélie, MSc⁴; Arsenault Benoit J., MSc⁴; Couture Christian, MD⁴; Mathieu Patrick, MD¹.

From : ¹ Laboratoire d'Études Moléculaires des Valvulopathies (LEMV), Laval Hospital Research Center/ Quebec Heart Institute, Department of Surgery, Laval University, Québec, Canada.

² Department of Medicine, Laval University, Québec, Canada.

³ Division of Kinesiology, Department of Social and Preventive Medicine, Laval University, Québec, Canada.

⁴ Department of Anatomy and Physiology, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, Canada.

⁵ Department of Pathology, Laval University, Québec, Canada.

Running title: Tissue remodeling, aortic stenosis, plasma oxidized-LDL

Financial support: This work was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR), Ottawa, Canada, grant number MOP 79342, and the Quebec Heart Institute Foundation. Dr. Pibarot holds the Canada Research Chair in Valvular Heart Diseases, Canadian Institutes of Health Research, Ottawa, Ontario, Canada. Dr Després is the scientific

director of the International Chair on Cardiometabolic Risk at University Laval, which is supported by an unrestricted grant from Sanofi-Aventis. Dr Mohty is supported by a postdoctoral fellow scholarship from the training program in obesity, Canadian Institutes of Health Research, Ottawa, Canada. Dr Mathieu is a research scholar from the Fonds de Recherches en Santé du Québec, Montreal, Canada.

Address for correspondence:

Dr Patrick Mathieu,

Laval Hospital

2725 Chemin Ste-Foy

Quebec, PQ, Canada

G1V-4G5

Telephone number: 418-656-4717

Fax number: 418-656-4707

E-mail address:

patrick.mathieu@chg.ulaval.ca

2.3 Abstract

Introduction: Aortic stenosis (AS) is the most common valvular heart disease in westernized societies. AS is a disease process akin to atherosclerosis in which calcification and tissue remodeling play a crucial role. In patients with moderate/severe AS, we sought to determine if the remodeling process would be in relationship with transvalvular gradients and circulating oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) levels.

Methods: In 105 patients with AS, the aortic valve and blood plasma were collected at the time of valve replacement surgery. The degree of valve tissue remodeling was assessed using a scoring system (Score: 1-4) and the amount of calcium within the valve cusps was determined. Standard plasma lipid profile as well as the size of LDL particles and the plasma level of circulating ox-LDL (4E6 antibody) were determined.

Results: After adjustment for covariables, aortic remodeling score was significantly related to transvalvular gradients measured by Doppler-echocardiography before surgery. Patients with higher valve remodeling score had higher circulating ox-LDL levels (score 2: 27.3 ± 2.6 U/L; score 3: 32.2 ± 2.3 U/L; score 4: 38.3 ± 2.3 U/L; $p=0.02$). After correction for age, gender, hypertension and HDL-C, the plasma level of ox-LDL remained significantly

associated with the aortic valve remodeling score ($p=0.0009$). The plasma level of ox-LDL was significantly associated with LDL-C ($r=0.40$; $p<0.0001$), apoB ($r=0.59$; $p<0.0001$), triglyceride ($r=0.39$; $p<0.0001$), Apo A-I ($r=0.23$; $p=0.01$) and cholesterol in small ($<255 \text{ \AA}$) LDL particles ($r=0.22$; $p=0.02$). After correction for covariables, circulating ox-LDL levels remained significantly associated with apoB ($p=0.0003$) and triglyceride ($p=0.01$) levels.

Conclusion: Increased level of circulating ox-LDL is associated with worse fibro-calcific remodeling of valvular tissue in AS. It remains to be determined whether circulating ox-LDL is a risk marker for a highly atherogenic profile and/or a circulating molecule which is actively involved in the pathogenesis of calcific aortic valve disease.

2.3 Introduction

Aortic stenosis (AS) is the most common valvular heart disease in westernized societies. Severe AS affects up to 3% of individuals over the age of 65, and it is the third cardiovascular disease in importance after coronary artery disease (CAD) and hypertension.[1,2] AS progresses over several decades during which the valve leaflets undergo extensive fibro-calcific tissue remodeling. For years, AS was believed to be a degenerative disease due to a « wear and tear » process. However, it was recently demonstrated that AS is a disease process akin to atherosclerosis.[3] AS has been linked to several risk factors for coronary artery disease or peripheral arterial disease. In addition, histological analyses of explanted valves have revealed that lipoprotein deposition, chronic inflammation, and active calcification play a determinant role in the disease process.[4,5,6]

Over the recent years several studies have highlighted the pivotal role of ox-LDL as activator of inflammation and atherosclerosis development. In atherosclerotic plaques, ox-LDL promotes the recruitment of inflammatory cells and the production of cytokines, which are involved in the tissue remodeling process and disease progression.[7] In AS valves, valvular infiltration by ox-LDL has been well documented, and has been shown to colocalize with inflammatory infiltrates and calcific nodules.[4,5] These previous studies therefore support the concept that AS development may be, at least in part, influenced by ox-LDL. Recently, several studies have reported an association between high plasma levels of ox-LDL and CAD and have demonstrated its usefulness as an independent risk marker for coronary events.[8,9,10] We therefore hypothesized that increased level of circulating ox-LDL enhances the fibro-calcific remodeling of AS valves.

2.4 Material and methods

Patients and tissue collection

We examined 105 AS valves that were explanted from patients at the time of aortic valve replacement for a stenosis. Valves with an aortic regurgitation grade > 2+ and valves of patients with a history of rheumatic disease, endocarditis or an inflammatory disease were excluded. All patients underwent a comprehensive Doppler echocardiographic examination preoperatively. Doppler echocardiographic measurements included the left ventricular stroke volume and transvalvular gradients using modified Bernoulli equation. Patients with reduced left ventricular ejection fraction (LVEF) (<40%) were excluded. Two segments of the aortic valve were partially decalcified in Cal-Ex (Fisher, Nepean, Ont, Can) for 24 hours and then one segment was fixed in formaldehyde 10% for histological processing and the other one was embedded in optimum cutting temperature (OCT) compound (TissueTek, Miles Laboratories, Elkhart, Ind, USA) and frozen in liquid nitrogen for immunohistochemical analyses.

Histological analysis and tissue remodeling score

Decalcified and fixed tissues were processed for paraffin embedding. Valve samples were excised vertically to the base at the midpoint. Five 5- μ m-thick sections were obtained and stained with hematoxylin-eosin (H&E). Histological sections were analyzed and the degree of valvular tissue remodeling and calcification was assessed using a scoring system adapted and modified from Warren et al.[11] Score 1: mild fibrous thickening, structural integrity of the cusps is maintained; Score 2: moderate valve thickening and

early nodular calcification with preservation of the fibrosa; Score 3: severe thickening with many calcified nodules and a distorted fibrosa; Score 4 severe thickening and distortion with many calcified nodules, important fibrosis and destruction of most structural components with disruption of elastic tissue. The remodeling score was attributed by an experienced cardiovascular pathologist (C.C.) blinded to clinical and echocardiographic data.

Determination of valvular calcium concentration

A segment of valve tissue was kept in liquid nitrogen until determination of the calcium content. Leaflets were homogenized and treated with HCl 6N at 95°C during 24 hours. Then treated tissues were centrifuged at 4400 RPM during 30 min and supernatants were collected. Calcium content was determined by the *o*-cresolphthalein complexone method. Results were expressed as mg of calcium per wet weight of tissue (Ca mg/g ww).

Lipid profile

Overnight fasting plasma was collected and immediately processed by the laboratory for the measurement of glucose, total cholesterol, low density-cholesterol (LDL-C), high density-cholesterol (HDL-C), and triglyceride levels. After centrifugation, one plasma specimen was kept and stored at -80 °C until measurement of C-reactive protein (CRP), LDL particle size, HDL particle size and circulating levels of ox-LDL. Methods used to measure CRP, LDL and HDL particle size have been detailed previously.[12,13] Briefly, LDL particle size was determined using nondenaturing 2-16% polyacrylamide gradient gel electrophoresis. LDL peak particle size corresponded to the estimated diameter of the major peak in each patient. The relative proportion of small LDL

particles (termed %LDL_{<255Å}) was determined by computing the relative area of the densitometric scan <255Å. Cholesterol levels in small LDL particles (termed LDL-C_{<255Å}) was estimated by multiplying the total LDL-C levels by the relative proportion of %LDL_{<255Å}. HDL particle size was also determined by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (4-30%). HDL size was extrapolated from the relative migration of eight standards of known diameters. Plasma apoA-I and apoB concentrations were measured by nephelometry as previously described.[14]

Measurement of circulating oxidized-LDL

Plasma ox-LDL was measured by sandwich ELISA with the monoclonal antibody 4E6 (MercoDIA, Uppsala, Sweden) directed against the modified apoB-100 of ox-LDL. The test was conducted according to the manufacturer instructions and optical density was read at 450 nm. Results were expressed as units per liter (U/l).

Statistical analysis

Continuous data were expressed as mean \pm SEM and compared using a Wilcoxon test to examine the effect of group. A Tukey's test was used for pairwise comparisons. Categorical data were expressed as a percentage and compared with the chi-square test. Correlation analyses were determined using Spearman's coefficients. We used a multiple linear regression analysis to identify the variables independently associated with the transvalvular gradients and with the plasma ox-LDL level and a multiple logistic regression analysis to identify those associated with the valve remodelling score. Relevant variables were first tested on univariate analysis and those with a p value

<0.05 were then entered in the multivariate models. Statistical analysis was performed with a commercially available software package JMP IN 5.1.

2.5 Results

Demographic data and clinical risk factors

The clinical data and risk factors are presented in table I. In the whole cohort of patients (n=105), there was a predominance of male patients (68%) with a mean age of 70 ± 2 years. The average peak transvalvular gradient was 71.6 ± 2.1 mmHg (range 21-124 mmHg), and the average aortic valve area (AVA) was 0.77 ± 0.02 cm² (0.4-1.6 cm²). The stenosis was severe (AVA ≤ 1.0 cm²) in 90% of the patients. The predominant risk factors were hypertension (61%) and diabetes (23%). A high proportion of patients were on statin treatment (69%). In this series with predominantly severe AS, all patients had at least a score ≥ 2 with the following distribution: score 2 (n=29; 28 %), score 3 (n=38; 36 %), and score 4 (n=38; 36 %). More than half of the population (56%) had an associated coronary artery disease (CAD) which was equally distributed among the different valve remodeling scores. Patients with a grade 3 remodeling score had a significantly higher prevalence of hypertension (p=0.03), whereas the distribution of diabetes was similar among the different groups. Although not significant, there was a trend for a higher proportion of males in patients with higher remodeling score (p=0.05).

Table I : Clinical data and plasma metabolic profile in patients with aortic stenosis according to the valve tissue remodeling score

Variables	All patients (n=105)	Score 2 (n=29)	Score 3 (n=38)	Score 4 (n=38)	p Wilcoxon
Age	70±2	67±2	71±2	70±2	0.28
Gender (male)	68%	54%	65%	82%	0.05
Diabetes	23%	18%	24%	26%	0.71
Hypertension	61%	43%	76%	61%	0.03
CAD	56%	54%	65%	50%	0.40
BMI	28.3±0.6	28.1±1.2	27.6±1.1	29.1±1.1	0.84
Waist circumference (cm)	100.6±1.6	100.8±3.1	102.2±2.6	98.7±2.8	0.72
Statins	69%	58%	85%	66%	0.12
ACE inhibitors	30%	25%	38%	27%	0.60
Bicuspid valves	26%	19%	20%	36%	0.15
Smoking	3.8%	0%	2.6%	7.9%	0.22
Aortic peak gradient (mmHg)	71.6±2.1	64.5±3.5	65.3±3.2	83.2±3.1	<0.0001
Aortic mean gradient (mmHg)	42.6±1.35	39.1±2.3	37.6±2.1	50.1±2.0	<0.0001
Aortic valve area (cm ²)	0.77±0.02	0.79±0.03	0.83±0.03	0.70±0.03	0.04
Creatinine (μmol/L)	92.8±2.2	87.3±4.2	96.4±3.7	93.6±3.7	0.34
Glycemia (mmol/L)	5.6±0.1	5.4±0.2	5.6±0.2	5.6±0.2	0.75
LDL-C (mmol/L)	2.35±0.09	2.45±0.18	2.15±0.15	2.48±0.15	0.45
HDL-C (mmol/L)	1.32±0.03	1.41±0.06	1.26±0.06	1.32±0.06	0.03
Triglyceride (mmol/L)	1.36±0.06	1.28±0.12	1.25±0.11	1.55±0.10	0.20
ApoB (g/L)	0.70±0.02	0.67±0.05	0.65±0.04	0.77±0.04	0.07
ApoA-I (g/L)	1.12±0.02	1.11±0.04	1.11±0.03	1.13±0.03	0.95
LDL peak size (Å)	259.3±0.6	259.5±1.2	259.3±1.0	259.1±1.0	0.96
HDL peak size (Å)	84.9±0.6	84.8±1.1	86.4±1.0	83.5±1.0	0.11
%LDL<255Å	37.1±2.1%	33.1±4.0%	39.9±3.4%	38.5±3.4%	0.41
LDL-C<255Å (mmol/L)	0.82±0.05	0.79±0.10	0.84±0.08	0.85±0.08	0.89
CRP(mg/L)	2.21±0.25	2.41±0.47	2.47±0.42	1.80±0.42	0.48
Circulating ox-LDL (U/L)	32.9±1.5	27.3±2.6	32.2±2.3	38.3±2.3	0.02

CAD: coronary artery disease; BMI: body mass index; ACE: angiotensin converting enzyme; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; Apo: apolipoprotein; CRP: c reactive protein; ox-LDL: oxidized low-density lipoprotein

Relationship between valve tissue remodeling and stenosis hemodynamic severity

The valve remodeling score correlated with the valvular calcium content ($r=0.32$; $p=0.001$). The average calcium content was 45.6 mg/g ww, 58.4±5.8 mg/g ww, and 76.6±6.0 mg/g ww in valves with aortic remodeling score 2, 3, and 4, respectively ($p=0.003$) (figure 1).

Patients with a valve remodeling score of 4 had higher peak and mean transvalvular gradients and lower aortic valve area, compared to those with a lower score (Table I). The valve remodeling score correlated with the peak

($r=0.36$; $p=0.0003$) and mean ($r=0.32$; $p=0.001$) gradients and with the aortic valve area ($r=-0.24$; $p=0.04$). The aortic valve calcium content also correlated, but to a lesser extent, with the mean gradient ($r=0.20$; $p=0.04$) and AVA ($r=-0.22$; $p=0.01$). There was no significant correlation between calcium content and peak gradient ($r=0.15$; $p=0.09$) (Table II). After correction for age and gender, we found that only the aortic remodeling score was significantly associated with the peak aortic transvalvular gradient ($p<0.0001$) and the mean aortic transvalvular gradient ($p=0.0002$) (table III).

Table II: Correlations between the hemodynamic stenosis severity of the aortic valve and the valvular calcium content and remodeling score.

	Valve calcium content	Valve remodeling score
Peak aortic transvalvular gradient	0.15	0.36**
Mean aortic transvalvular gradient	0.20*	0.32**
Aortic valve area	-0.22*	-0.24*

Spearman's coefficient

* $p<0.05$

** $p<0.001$

Table III: Multivariate linear model for peak and mean aortic transvalvular gradient

	Multivariate linear model					
	Peak aortic transvalvular gradient			Mean aortic transvalvular gradient		
	β	SE	p	β	SE	p
Age	-0.39	0.18	0.03	-0.27	0.11	0.02
Gender (male)	-3.86	2.26	0.09	-2.88	1.46	0.05
Aortic calcium content	0.05	0.05	0.39	0.03	0.03	0.42
Aortic remodeling score	12.33	2.81	<0.0001	7.25	1.82	0.0002

r^2 adjusted=0.24; $p<0.0001$

r^2 adjusted=0.21; $p=0.0002$

Relationship between plasma lipid profile and valve remodeling score

Patients with a grade 2 valve remodeling score had higher HDL-C when compared to those with a higher score ($p=0.03$). The level of apoB had a tendency to be higher in valves with the highest remodeling score ($p=0.07$), whereas levels of LDL-C were similar among the 3 groups. The size of HDL and LDL particles including the proportion of small size LDL subfraction ($<255 \text{ \AA}$) were also similar among groups of remodeling score. In addition, the levels of CRP were also similar between groups. However, plasma ox-LDL levels was significantly elevated in patients with the highest valve remodeling scores (score 2: $27.3 \pm 2.6 \text{ U/L}$; score 3: $32.2 \pm 2.3 \text{ U/L}$; score 4: $38.3 \pm 2.3 \text{ U/L}$; $p=0.02$). After adjustment for age, gender, hypertension, and HDL-C, plasma ox-LDL level remained significantly associated with the aortic remodeling score ($p=0.0009$) (Table IV). There was no significant association between plasma ox-LDL level and transvalvular gradients or AVA.

Table IV: Multivariate logistic regression model for the aortic remodeling score

	β	SE	p
Age	0.0075	0.009	0.57
Gender (male)	0.23	0.09	0.01
Hypertension	0.18	0.09	0.04
HDL-C	0.02	0.25	0.91
Plasma ox-LDL	0.02	0.006	0.0009

$r^2_{\text{adjusted}}=0.18$
 $P=0.002$

Factors associated with the ox-LDL plasma level

Ox-LDL levels were similar between patients with or without coronary artery disease (CAD). The mean ox-LDL value was 33.6 ± 1.8 U/L and 35.8 ± 1.9 U/L respectively for patient with and without angiographically proven CAD ($p=0.40$). Circulating ox-LDL level was not affected by gender ($p=0.99$), diabetes ($p=0.75$) or hypertension ($p=0.48$). Active smoker patients had a tendency for having higher plasma ox-LDL levels: 43.9 ± 6.2 U/L vs. 33.9 ± 1.3 U/L ($p=0.08$). Patients on statin treatment had significantly lower plasma ox-LDL levels: 33.2 ± 1.6 U/L vs. 39.5 ± 3.13 U/L ($p=0.04$). Circulating ox-LDL level also correlated significantly with the following plasma variables: apoB ($r=0.59$; $p<0.0001$), LDL-C ($r=0.40$; $p<0.0001$), triglyceride ($r=0.39$; $p<0.0001$), LDL-C $<255\text{\AA}$ ($r=0.22$; $p=0.02$) and apoA-I ($r=0.23$; $p=0.01$). Ox-LDL levels were not associated with CRP, waist circumference or BMI. After adjustment for covariables in a model explaining 36% of the variation of circulating ox-LDL, we found that apoB ($p=0.0003$) and triglyceride levels ($p=0.01$) were the only variables significantly associated with plasma ox-LDL level. In a second model where smoking status and statin treatment were introduced into the model (r^2 adjusted=0.38; $p<0.0001$), apoB ($p=0.002$), triglyceride levels ($p=0.02$) and smoking status ($p=0.01$) were significantly associated with plasma ox-LDL levels, while statin treatment ($p=0.39$) was not (Table V).

Table V: Multivariate linear regression model for plasma oxidized-LDL

	β	SE	p
Age	0.23	0.12	0.07
Gender (male)	1.39	1.43	0.33
Triglyceride	4.12	1.84	0.02
LDL-C	1.62	2.20	0.46
%LDL-C<255Å	-2.43	3.14	0.44
ApoB	26.3	8.45	0.002
ApoA-I	7.97	6.21	0.20
Statins	-2.47	2.89	0.39
Smoking	7.04	2.77	0.01

r^2 adjusted=0.38
p<0.0001

2.6 Discussion

The main findings of this study is that increased plasma ox-LDL is independently associated with more advanced aortic valve remodeling.

Aortic valve remodeling

AS development involves complex interactions between extracellular matrix, valve interstitial cells (ICs) and inflammatory infiltrates. Calcification of vascular cells and valve ICs has been ascribed to an active process analogous to the ossification process.[15,16] Previous studies have documented the presence of bone-associated proteins along with extensive tissue remodeling in explanted AS valves.[6,17,18]

Valve thickening and calcification are the main factors leading to reduced leaflet mobility and obstruction of the valve orifice in AS. Recently, Roberts et al.[19] reported that the weight of the explanted aortic valve correlates with the peak transvalvular gradient. In the present study, we found that a histological score of tissue remodeling, which takes into account presence and extent of calcification as well as the modifications of the extracellular matrix, correlates significantly with transvalvular gradients and AVA. Moreover, the valve remodeling score correlates better with the indices of stenosis hemodynamic severity than the valve calcium content. These observations suggest that beyond the production of calcium, remodeling of the extracellular matrix may contribute to valve cusp stiffening.

In a recent investigation, Messika-Zeitoun et al.[20] have shown that there is an excellent agreement between aortic valve calcification score

measured by electron-beam computed tomography (EBCT) and direct biochemical measurement of calcium in explanted valves. Moreover, the calcification measured by EBCT in patients with AS as well as in normal subjects correlates well with both peak transvalvular gradient and AVA measured by Doppler echocardiography. In the present study, we also found a significant correlation between the amount of valvular calcium and AVA. However, the correlation ($r=-0.22$) was much weaker than that observed in the study of Messika-Zeitoun et al. ($r=-0.79$). This may be explained by the fact that the relationship between valve calcium content and AVA is curvilinear and becomes relatively flat for values of AVA $< 1.0 \text{ cm}^2$. Ninety percent of the patients in our series had an AVA $< 1.0 \text{ cm}^2$, whereas in the series of Messika-Zeitoun et al., the AVA ranged from 4.0 and 0.5 cm^2 . When analyzed collectively, these findings support the concept that calcification is probably a predominant determinant of AS progression in the earlier stage of the disease, whereas in the more advanced stage of the disease, extracellular remodeling with progressive fibrosis may have, in addition to calcium deposition, an important contribution to disease progression.

Factors associated with aortic valve remodeling

Lipoprotein oxidation is thought to play a central role in the development of atherosclerosis.[21] Indeed, ox-LDLs are potent inductor of inflammation and are actively involved in the formation of foam cells. Similarly to vascular atherosclerosis, calcification of the aortic valve has been associated with tissue infiltration by oxidatively-modified lipoproteins.[4,5] Elevated circulating levels of ox-LDL have been linked to CAD and subclinical atherosclerosis.[8,10] However, one recent study reported that circulating ox-LDL level is not an independent predictor of CAD [22].

The present study is the first one to investigate the relationship between the plasma level of ox-LDL and calcific aortic valve disease. Among different plasma variables analyzed in this study, only circulating ox-LDL was independently associated with aortic valvular remodeling process. In healthy men high plasma ox-LDL levels predicted the development of cardiovascular events.[23] Recently, it has been reported that elevated plasma ox-LDL level is associated with activation of inflammation in circulating leukocytes through the NF- κ B pathway, suggesting that the circulating fraction of ox-LDL is biologically active.[9] In line with this observation, previous investigations have found a positive association between circulating ox-LDL and CRP levels, suggesting that ox-LDL are possibly involved in the activation of immune-mediated reactions.[8] However, in the present study CRP levels were neither associated with ox-LDL levels nor with the aortic remodeling process. Nevertheless, we can not exclude the possibility that plasma ox-LDL is associated with other inflammatory pathways in patients with AS.

Clinical implications

This study as well as other previous studies have linked the plasma ox-LDL levels with some features of the metabolic syndrome.[24,25,26] In the present study, we have observed that the apo B and triglyceride levels are independently associated with plasma ox-LDL. Interestingly, we have recently reported that AS progression rate was faster in patients with the metabolic syndrome.[27] Although a causal relationship cannot be confirmed from this study, the level of circulating ox-LDL may, at least in part, represent a significant metabolic risk marker of an active aortic valve remodeling process. Nonetheless, it is also possible that plasma ox-LDL represent a biologically active factor which activates cellular receptors. Indeed, the lectin-like ox-LDL receptor-1 (LOX-1) is expressed by monocytes and the endothelium.[9] Thus,

through LOX-1 receptors circulating ox-LDL would have the ability to activate valvular endothelium and thereby contributing to enhance valve inflammation and possibly remodeling process. Therefore, although still unproven, it is possible that specific behavioral or pharmacological interventions targeting plasma ox-LDL levels would contribute to decrease aortic valve remodeling and thereby slow the progression of AS. In this regard, previous studies have demonstrated that statin therapy may significantly reduce plasma ox-LDL levels.[28] Although the role of statins in patients with AS is not clearly established,[29,30] the effect of a lipid lowering therapy on the plasma ox-LDL level and its relation with AS progression rate remains to be studied. In the present study after correction for covariates, statin therapy was not independently associated with lower plasma ox-LDL levels, whereas smoking was associated with a significant increase of circulating ox-LDL. Thus, it remains to be determined whether appropriate life style interventions and/or pharmacological treatment leading to reduction in plasma ox-LDL level would be beneficial in patients with AS.

Limitations

This cross-sectional study has some inherent limitations insofar it included patients with an advanced pathological process necessitating an aortic valve replacement. In order to have a more complete assessment of the mechanisms implicated in the fibro-calcific remodeling of the aortic valve, it would have been necessary to perform serial evaluations of the histologic architecture of the valve at different stages of the disease, which was not possible in this study. Thus, histopathological changes that have occurred from a pre-pathologic state, referred to as remodeling in this study, implies that gradual changes took place for years. In light of this inherent limitation, the

results and conclusions of this study should be restricted to end-stage AS and can not be directly extrapolated to the whole spectrum of the disease process. Also, clinical data were collected at the time of operation and some important data were missing, such as the duration of statin treatment prior to aortic valve replacement. This lack of information may have limited our ability to detect a potential significant effect of lipid-lowering therapy on either the plasma ox-LDL levels or the valve remodeling process.

2.8 Conclusion

There is now a strong evidence supporting the concept that AS development and progression is an atherosclerotic-like process. Precise mechanisms by which AS develop and progress however remain to be elucidated. The present study is the first to report that plasma level of oxidized LDL is independently associated with aortic valve remodeling in patients with severe AS. Further studies are needed to determine whether circulating ox-LDL is a risk marker for a highly atherogenic profile and/or a circulating molecule which is actively involved in the pathogenesis of calcific aortic valve disease.

2.9 Acknowledgements

The authors would like to thank Brigitte Dionne, Stephanie Dionne, and Martine Fleury for their technical assistance.

Disclosures:

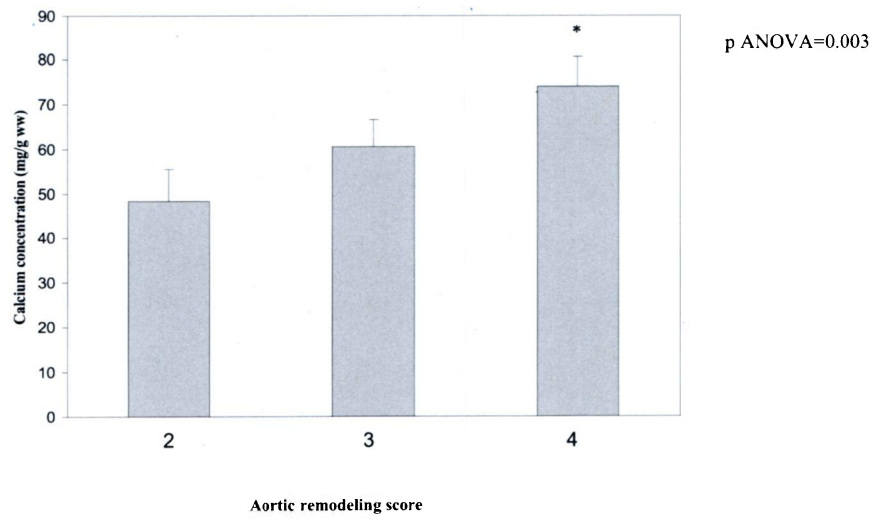
The authors have no disclosures

2.10 Figures legend

Figure 1: Aortic valve calcium content in relation with the valve remodeling score.* $p < 0.05$ compared to remodeling score of 2.

2.11 Figure

Figure 1



2.12 Bibliography

- 1 Rajamannan NM, Gersh B, Bonow RO. Calcific aortic stenosis: from bench to the bedside--emerging clinical and cellular concepts. *Heart* 2003;**89**:801-805.
- 2 O'Brien KD. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:1721-1728.
- 3 Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 1997;**29**:630-634.
- 4 Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;**19**:1218-1222.
- 5 Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, et al. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994;**90**:844-853.
- 6 Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* 2003;**107**:2181-2184.
- 7 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;**352**:1685-1695.
- 8 Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**:1162-1167.

- 9 Cominacini L, Anselmi M, Garbin U, et al. Enhanced plasma levels of oxidized low-density lipoprotein increase circulating nuclear factor-kappa B activation in patients with unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 2005;**46**:799-806.
- 10 Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, et al. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;**353**:46-57.
- 11 Warren BA, Yong JL. Calcification of the aortic valve: its progression and grading. *Pathology* 1997;**29**:360-368.
- 12 St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, et al. Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up data from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:553-559.
- 13 Hogue JC, Lamarche B, Gaudet D, et al. Association of heterozygous familial hypercholesterolemia with smaller HDL particle size. *Atherosclerosis* 2007;**190**:429-435.
- 14 An P, Rice T, Gagnon J, et al. Segregation analysis of apolipoproteins A-1 and B-100 measured before and after an exercise training program: the HERITAGE Family Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:807-814.
- 15 Parhami F, Tintut Y, Patel JK, et al. Regulation of vascular calcification in atherosclerosis. *Z Kardiol* 2001;**90 Suppl 3**:27-30.
- 16 Mathieu P, Voisine P, Pepin A, et al. Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis* 2005;**14**:353-357.

- 17 Mohler ER, III, Gannon F, Reynolds C, et al. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 2001;**103**:1522-1528.
- 18 Charest A, Pepin A, Shetty R, et al. Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis. *Heart* 2006;**92**:1844-1849.
- 19 Roberts WC, Ko JM. Relation of weights of operatively excised stenotic aortic valves to preoperative transvalvular peak systolic pressure gradients and to calculated aortic valve areas. *J Am Coll Cardiol* 2004;**44**:1847-1855.
- 20 Messika-Zeitoun D, Aubry MC, Detaint D, et al. Evaluation and clinical implications of aortic valve calcification measured by electron-beam computed tomography. *Circulation* 2004;**110**:356-362.
- 21 Young IS, McFarlane C, McEneny J. Oxidative modification of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem Soc Trans* 2003;**31**:1062-1065.
- 22 Wu T, Willett WC, Rifai N, et al. Is plasma oxidized low-density lipoprotein, measured with the widely used antibody 4E6, an independent predictor of coronary heart disease among U.S. men and women. *J Am Coll Cardiol* 2006;**48**:973-979.
- 23 Meisinger C, Baumert J, Khuseyinova N, et al. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* 2005;**112**:651-657.
- 24 Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol* 2004;**59**:479-484.

- 25 Yamagishi S, Matsuoka H, Kitano S, et al. Elevated circulating oxidized LDL levels in Japanese subjects with the metabolic syndrome. *Int J Cardiol* 2007;**118**:270-272.
- 26 Lapointe A, Couillard C, Piche ME, et al. Circulating oxidized LDL is associated with parameters of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2007;**191**:362-368.
- 27 Briand M, Lemieux I, Dumesnil JG, et al. Metabolic syndrome negatively influences disease progression and prognosis in aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2006;**47**:2229-2236.
- 28 Paniagua JA, Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, et al. Oxidized-LDL levels are changed during short-term serum glucose variations and lowered with statin treatment in early Type 2 diabetes: a study of endothelial function and microalbuminuria. *Diabet Med* 2005;**22**:1647-1656.
- 29 Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, et al. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med* 2005;**352**:2389-2397.
- 30 Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, et al. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2007;**49**:554-561.

Chapitre 3

Conclusion

Les premières observations sur la SA datent du début des années 1900. Depuis, les connaissances sur cette maladie ont beaucoup évolué. Considérée à l'origine comme étant une maladie dégénérative due à l'usure et à la calcification passive des feuillets de la valve, la SA est aujourd'hui reconnue comme étant une maladie s'apparentant à l'athérosclérose, où l'infiltration lipidique est un des facteurs d'initiation qui entraîne une inflammation chronique ainsi qu'un processus actif de calcification et de remodelage. Malgré les avancées réalisées, le seul traitement lors d'une SA sévère symptomatique demeure le RVA et la SA est la première cause de chirurgie de remplacement valvulaire autant en Amérique du Nord qu'en Europe.¹⁹ Plusieurs études ont rapporté une association entre de nombreux facteurs athérogéniques dont le LDL-C et la SA.^{10,24,180-182} L'utilisation de statines a alors été proposée comme un traitement prometteur pour ralentir la progression de la SA. Bien que plusieurs études rétrospectives aient démontré que les statines pouvaient ralentir la progression de la maladie, les études prospectives ont abouti à des résultats contradictoires. Il n'existe donc aucun traitement à ce jour qui soit éprouvé comme étant en mesure de ralentir la progression de la SA. Pour ces raisons et comme l'indiquait le Dr Nalini Rajamannan dans un éditorial publié dans la revue *Circulation* en novembre 2006¹⁸³, la SA est fin prête pour être mise à l'avant plan.

Des modèles animaux de SA développés durant les dernières années, ainsi que la recherche au niveau fondamental et clinique ont permis de mieux

comprendre la SA.^{36,37,184} Malgré l'avancement des connaissances, aucun traitement ne permet présentement de ralentir la progression de la maladie. Il est donc primordial de connaître les mécanismes et les molécules impliqués dans l'initiation et le développement de la SA pour être en mesure d'agir de façon préventive ou curative. Il est tout aussi important de mieux cibler les facteurs de risque inhérents au développement et à la progression de la SA.

Par exemple, l'hypercholestérolémie est un facteur de risque autant pour les maladies cardiovasculaires en général que pour la SA en particulier.^{24,25,182} Plusieurs patients souffrant de SA sont déjà sous traitement avec statine et ont atteint des taux de LDL-C jugés comme étant normaux, mais voient malheureusement leur maladie continuer de progresser. Il apparaît donc que le problème ne se situe pas seulement au niveau de l'hypercholestérolémie. Les troubles liés à l'obésité et au syndrome métabolique, caractérisés entre autres par une obésité viscérale, prennent des proportions épidémiques dans nos sociétés industrialisées et plusieurs désordres métaboliques ainsi qu'un état pro-inflammatoire et pro-oxydant sont associés à l'obésité, particulièrement lorsque celle-ci est viscérale. L'obésité viscérale est liée à de la résistance à l'insuline ainsi qu'à un risque plus élevé de développer un diabète de type II. L'obésité viscérale est aussi liée à un risque accru de maladies cardiovasculaires.¹⁸⁵ Le tissu adipeux est en mesure de produire des cytokines pro-inflammatoires tel que l'IL-6 et le TNF- α , qui contribue à l'état pro-inflammatoire des personnes avec obésité abdominale. L'obésité viscérale est liée à des niveaux plus élevés de particules de LDL petites et denses. Il a été démontré que ces particules de LDL petites et denses sont plus athérogènes et plus sensibles à l'oxydation.^{150,151}

Parmi les autres caractéristiques de l'obésité viscérale, il y a une diminution du HDL-C ainsi que de l'hypertension. L'hypertension ajoute un stress mécanique et facilite l'entrée des petites particules de LDL dans

l'endothélium des feuillets de la valve⁴⁷, ces petites particules s'oxydant par la suite, ce qui entraînerait l'inflammation de la valve, le recrutement de cellules inflammatoires, le tout menant au remodelage et la calcification des feuillets de la valve.^{3,186,187} De son côté, le HDL est un puissant anti-oxydant qui prévient l'oxydation des particules de LDL.¹⁸⁸ Une diminution du HDL peut donc mener à une plus grande oxydation des particules de LDL. Depuis quelques années, la présence de ces particules oxydées dans le plasma peut être mesurée facilement.^{189,190} Il a été démontré que la mesure des LDL oxydées plasmatiques était en lien avec de futurs événements de maladies coronariennes.¹³⁰ Dans une cohorte d'individus âgés, une association entre le syndrome métabolique et la prévalence d'ox-LDL plasmatiques a été démontré. De plus, les personnes avec des taux d'ox-LDL plasmatiques plus élevés étaient plus à risque de maladies coronariennes.¹³²

Un autre aspect important de la SA consiste dans le suivi de la maladie et des caractéristiques cliniques qui permettent d'évaluer sa progression. Pour certains patients, la progression se fera très lentement et ces patients ne deviendront peut-être jamais symptomatiques. Par contre, d'autres patients verront leur maladie progresser rapidement vers une SA symptomatique dont le seul traitement est le RVA. Le RVA n'est pas à prendre à la légère puisqu'il s'agit d'une procédure qui comporte des risques et entraîne des inconvénients pour les patients. Rien n'est comparable à la valve native et il serait préférable de traiter le patient de façon à ce qu'il puisse continuer à vivre avec sa propre valve aortique plutôt que de devoir recourir à une valve de remplacement. Certains facteurs cliniques tel que l'aire valvulaire, la vélocité du jet aortique ou le gradient trans-valvulaire permettent d'évaluer la sévérité de la maladie, mais ces facteurs cliniques peuvent varier d'un patient à l'autre et ce qui cause la progression rapide de la maladie est mal connu. Les facteurs de risque déjà reconnus dans la SA et dans l'athérosclérose, soit le LDL-cholestérol élevé, l'hypertension, le tabagisme, le sexe masculin ainsi que le diabète, ne

permettent pas de prédire l'évolution de la maladie. De plus, il apparaît de plus en plus clair que l'initiation de la maladie ainsi que sa progression vont bien au-delà de ces facteurs de risque traditionnels.

L'étude que nous avons réalisée nous a permis d'établir un lien entre le remodelage de la valve aortique et les taux de ox-LDL plasmatiques. Le remodelage est un facteur important dans la progression de la maladie et nous avons démontré que les niveaux d'ox-LDL retrouvés dans le plasma sont associés de manière indépendante avec le remodelage de la valve aortique dans la SA. La mesure des taux d'ox-LDL plasmatiques pourrait devenir un indicateur de l'évolution de la maladie et du risque que celle-ci progresse vers le déclenchement de symptômes puisque le remodelage, qui inclut la présence de calcifications, est l'un des principaux facteurs menant à une mobilité réduite des feuillets de la valve et à l'obstruction de l'orifice de la valve. Par contre, l'état des connaissances ne nous permet pas de savoir si les particules de LDL oxydées plasmatiques ne sont qu'un marqueur de maladies athérosclérotiques ou si ces particules peuvent aussi jouer un rôle actif dans le développement, la progression et la sévérité de la SA. Il a été démontré que les niveaux élevés d'ox-LDL plasmatiques sont associés à l'activation d'une réponse inflammatoire par les leucocytes circulants, et ce via la voie NF- κ B. Ces résultats laissent croire que la fraction des ox-LDL en circulation serait biologiquement active.¹⁶⁷ Aussi, il est connu que les ox-LDL peuvent être reconnus par les récepteurs scavengers, mais il n'existe aucune donnée à savoir si, dans la SA, ses récepteurs peuvent capter les ox-LDL en circulation et si oui, quels récepteurs scavengers sont impliqués. Dans le cas où les récepteurs scavengers peuvent lier les ox-LDL plasmatiques, il serait important d'étudier les voies de signalisation impliquées ainsi que leur effet sur l'inflammation, le remodelage et la calcification. Ces voies pourraient alors devenir des cibles dans l'éventualité du traitement thérapeutique de la SA.

Il semble évident que les meilleurs moyens d'éviter les désordres métaboliques liés à l'obésité, particulièrement viscérale, sont de manger sainement et de faire de l'exercice. Par contre, la SA est une maladie s'apparentant à l'athérosclérose et comme dans le cas de celle-ci, la maladie est diagnostiquée le plus souvent à un âge avancé dans la vie alors que son initiation et son développement se font à un âge beaucoup plus jeune. Il se peut alors que le fait d'adopter de saines habitudes de vie chez des patients plus âgés ne soient pas suffisant pour ralentir le processus pathologique. Les statines sont très efficaces pour permettre d'abaisser les taux de LDL-C, mais la plupart augmentent peu ou pas le HDL. De plus, les statines n'ont pas d'impact sur la taille des particules de LDL petites et denses. Ces deux facteurs sont déterminants dans l'oxydation des particules de LDL, qui sont à l'origine du développement de la SA. Les thérapies pharmacologiques visant à modifier les taux de LDL oxydées pourraient avoir un impact important sur la SA, particulièrement si ces particules se révèlent être biologiquement actives et impliquées dans la maladie. Il faudrait que les médicaments mis au point puissent, comme les statines, réduire les niveaux de LDL-C, mais ils devraient aussi faire en sorte que les particules de LDL soient plus grosses et moins denses. En effet, un phénotype de particules de LDL plus grosses ferait en sorte qu'elles seraient moins sujettes à l'oxydation et moins en mesure de pénétrer facilement l'endothélium. Les traitements pharmacologiques devraient aussi favoriser l'augmentation du HDL et devraient aussi faire en sorte que les particules de HDL soient plus petites et plus denses puisque ce sont ces particules qui possèdent un plus grand pouvoir anti-oxydant.¹⁸⁸

Enfin, la porte est ouverte à beaucoup plus de recherches sur la SA et les lipides oxydés. Il faudrait tout d'abord vérifier si les taux élevés d'ox-LDL plasmatiques sont un prédicteur d'une progression plus rapide de la SA, d'une plus grande sévérité de la maladie et/ou de la survenue d'événements cliniques,

tel que le besoin d'un RVA. Il faudrait pour cela mesurer les taux d'ox-LDL plasmatiques au début d'un suivi et voir si, dans le temps, ce paramètre s'avère prédire la progression et la sévérité de la maladie. D'autres études, seront nécessaires pour vérifier l'activation de récepteurs scavengers dans la valve aortique de patients avec SA par des ox-LDL plasmatiques et ainsi déterminer si ces ox-LDL circulants sont biologiquement actifs ou de simples marqueurs. Si les ox-LDL plasmatiques s'avère être biologiquement actif, des traitements pharmacologiques pourraient éventuellement être envisagés pour empêcher la liaison de lipides oxydés avec les récepteurs scavengers. Une thérapie où un médicament pourrait se lier aux ox-LDL dans le plasma sanguin pourrait aussi être envisagé. Cela aurait pour effet d'empêcher les ox-LDL en circulation de se lier à des récepteurs scavengers et ainsi d'activer les voies de signalisation propre à ces récepteurs. La même approche pourrait aussi empêcher les ox-LDL d'activer la réponse inflammatoire des leucocytes circulants via la voie de NF- κ B. Évidemment, si l'oxydation des lipides est due en grande partie par la présence d'une obésité viscérale causée par de mauvaises habitudes alimentaires et de la sédentarité, des modifications de ces habitudes de vie pourrait s'avérer être bénéfique pour aider à réduire les niveaux d'ox-LDL plasmatiques. Pour vérifier cette hypothèse, chez des sujets avec obésité viscérale, les taux de base d'ox-LDL plasmatiques pourraient être mesurés avant et après un programme prescrit qui inclurait de saines habitudes alimentaires et de l'exercice.

Bibliographie

1. Ward, C. Clinical significance of the bicuspid aortic valve. *Heart* **83**, 81-85 (2000).
2. Otto, C. M., Kuusisto, J., Reichenbach, D. D., Gown, A. M. & O'Brien, K. D. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* **90**, 844-853 (1994).
3. Olsson, M. et al. Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol* **23**, 1162-1170 (1994).
4. O'Brien, K. D. et al. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 523-532 (1996).
5. Olsson, M., Thyberg, J. & Nilsson, J. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1218-1222 (1999).
6. Wallby, L., Janerot-Sjoberg, B., Steffensen, T. & Broqvist, M. T lymphocyte infiltration in non-rheumatic aortic stenosis: a comparative descriptive study between tricuspid and bicuspid aortic valves. *Heart* **88**, 348-351 (2002).
7. Contrepois, A. Towards a history of infective endocarditis. *Med Hist* **40**, 25-54 (1996).
8. Rajamannan, N. M., Gersh, B. & Bonow, R. O. Calcific aortic stenosis: from bench to the bedside--emerging clinical and cellular concepts. *Heart* **89**, 801-805 (2003).
9. O'Brien, K. D. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1721-1728 (2006).
10. Stewart, B. F. et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* **29**, 630-634 (1997).
11. Lindroos, M., Kupari, M., Heikkila, J. & Tilvis, R. Prevalence of aortic valve abnormalities in the elderly: an echocardiographic study of a random population sample. *J Am Coll Cardiol* **21**, 1220-1225 (1993).
12. Otto, C. M., Lind, B. K., Kitzman, D. W., Gersh, B. J. & Siscovick, D. S. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med* **341**, 142-147 (1999).
13. Kelly, T. A. et al. Comparison of outcome of asymptomatic to symptomatic patients older than 20 years of age with valvular aortic stenosis. *Am J Cardiol* **61**, 123-130 (1988).
14. Horstkotte, D. & Loogen, F. The natural history of aortic valve stenosis. *Eur Heart J* **9 Suppl E**, 57-64 (1988).
15. Turina, J., Hess, O., Sepulcri, F. & Krayenbuehl, H. P. Spontaneous course of aortic valve disease. *Eur Heart J* **8**, 471-483 (1987).
16. Lindblom, D., Lindblom, U., Qvist, J. & Lundstrom, H. Long-term relative survival rates after heart valve replacement. *J Am Coll Cardiol* **15**, 566-573 (1990).
17. Kapila, A. & Hart, R. Calcific cerebral emboli and aortic stenosis: detection of computed tomography. *Stroke* **17**, 619-621 (1986).
18. Bartsch, B., Haase, K. K., Voelker, W., Schobel, W. A. & Karsch, K. R. [Risk of invasive diagnosis with retrograde catheterization of the left ventricle in patients with acquired aortic valve stenosis]. *Z Kardiol* **88**, 255-260 (1999).
19. Bonow, R. O. et al. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing committee to revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists: endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *Circulation* **114**, e84-231 (2006).

20. Otto, C. M., Pearlman, A. S. & Gardner, C. L. Hemodynamic progression of aortic stenosis in adults assessed by Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* **13**, 545-550 (1989).
21. Roger, V. L. et al. Progression of aortic stenosis in adults: new appraisal using Doppler echocardiography. *Am Heart J* **119**, 331-338 (1990).
22. Brener, S. J., Duffy, C. I., Thomas, J. D. & Stewart, W. J. Progression of aortic stenosis in 394 patients: relation to changes in myocardial and mitral valve dysfunction. *J Am Coll Cardiol* **25**, 305-310 (1995).
23. Faggiano, P., Aurigemma, G. P., Rusconi, C. & Gaasch, W. H. Progression of valvular aortic stenosis in adults: literature review and clinical implications. *Am Heart J* **132**, 408-417 (1996).
24. Aronow, W. S., Schwartz, K. S. & Koenigsberg, M. Correlation of serum lipids, calcium, and phosphorus, diabetes mellitus and history of systemic hypertension with presence or absence of calcified or thickened aortic cusps or root in elderly patients. *Am J Cardiol* **59**, 998-999 (1987).
25. Wilmshurst, P. T., Stevenson, R. N., Griffiths, H. & Lord, J. R. A case-control investigation of the relation between hyperlipidaemia and calcific aortic valve stenosis. *Heart* **78**, 475-479 (1997).
26. listed, N. a. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* **344**, 1383-1389 (1994).
27. listed, N. a. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med* **339**, 1349-1357 (1998).
28. Pitt, B. et al. Pravastatin limitation of atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC I): reduction in atherosclerosis progression and clinical events. PLAC I investigation. *J Am Coll Cardiol* **26**, 1133-1139 (1995).
29. Smilde, T. J. et al. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. *Lancet* **357**, 577-581 (2001).
30. Collins, R., Armitage, J., Parish, S., Sleight, P. & Peto, R. Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions. *Lancet* **363**, 757-767 (2004).
31. Corsini, A., Maggi, F. M. & Catapano, A. L. Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res* **31**, 9-27 (1995).
32. Ma, P. T. et al. Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8370-8374 (1986).
33. Sacks, F. M. et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* **335**, 1001-1009 (1996).
34. Nalbone, G., Bernot, D., Peiretti, F., Alessi, M.-C. & Juhan-Vague, I. Les statines en thérapeutique cardiovasculaire. *M/S: médecine sciences* **18**, 1257-1265 (2002).
35. Rajamannan, N. M. et al. Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve. *Heart* **91**, 806-810 (2005).
36. Rajamannan, N. M. et al. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve. *Circulation* **105**, 2660-2665 (2002).
37. Drolet, M. C., Arsenault, M. & Couet, J. Experimental aortic valve stenosis in rabbits. *J Am Coll Cardiol* **41**, 1211-1217 (2003).
38. Aronow, W. S., Ahn, C., Kronzon, I. & Goldman, M. E. Association of coronary risk factors and use of statins with progression of mild valvular aortic stenosis in older persons. *Am J Cardiol* **88**, 693-695 (2001).

39. Novaro, G. M. et al. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation* **104**, 2205-2209 (2001).
40. Pohle, K. et al. Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation* **104**, 1927-1932 (2001).
41. Bellamy, M. F., Pellikka, P. A., Klarich, K. W., Tajik, A. J. & Enriquez-Sarano, M. Association of cholesterol levels, hydroxymethylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitor treatment, and progression of aortic stenosis in the community. *J Am Coll Cardiol* **40**, 1723-1730 (2002).
42. Shavelle, D. M. et al. HMG CoA reductase inhibitor (statin) and aortic valve calcium. *Lancet* **359**, 1125-1126 (2002).
43. Rosenhek, R. et al. Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis. *Circulation* **110**, 1291-1295 (2004).
44. Farmer, J. A. Pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep* **2**, 208-217 (2000).
45. Cowell, S. J. et al. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med* **352**, 2389-2397 (2005).
46. Moura, L. M. et al. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* **49**, 554-561 (2007).
47. Mohler, E. R. r. et al. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* **103**, 1522-1528 (2001).
48. Warren, B. A. & Yong, J. L. Calcification of the aortic valve: its progression and grading. *Pathology* **29**, 360-368 (1997).
49. Bahler, R. C., Desser, D. R., Finkelhor, R. S., Brener, S. J. & Youssefi, M. Factors leading to progression of valvular aortic stenosis. *Am J Cardiol* **84**, 1044-1048 (1999).
50. Rosenhek, R. et al. Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *N Engl J Med* **343**, 611-617 (2000).
51. Mohler, E. R. r. et al. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis* **8**, 254-260 (1999).
52. Kaden, J. J. et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* **36**, 57-66 (2004).
53. Hirota, S. et al. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am J Pathol* **143**, 1003-1008 (1993).
54. Giachelli, C. M. et al. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **92**, 1686-1696 (1993).
55. O'Brien, K. D. et al. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* **92**, 2163-2168 (1995).
56. Mohler, E. R. r., Adam, L. P., McClelland, P., Graham, L. & Hathaway, D. R. Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 547-552 (1997).
57. Murry, C. E., Giachelli, C. M., Schwartz, S. M. & Vracko, R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* **145**, 1450-1462 (1994).
58. Steitz, S. A. et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* **161**, 2035-2046 (2002).
59. Miyachi, A. et al. Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem* **266**, 20369-20374 (1991).
60. Raisz, L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* **115**, 3318-3325 (2005).
61. Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-342 (2003).
62. Simonet, W. S. et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-319 (1997).

63. Hofbauer, L. C. et al. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 334-339 (2001).
64. Bucay, N. et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* **12**, 1260-1268 (1998).
65. Min, H. et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* **192**, 463-474 (2000).
66. Jian, B., Narula, N., Li, Q. Y., Mohler, E. R. r. & Levy, R. J. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg* **75**, 457-65; discussion 465-6 (2003).
67. Csiszar, A. et al. 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* **111**, 2364-2372 (2005).
68. Sorescu, G. P. et al. Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res* **95**, 773-779 (2004).
69. Tagliafico, E. et al. TGFbeta/BMP activate the smooth muscle/bone differentiation programs in mesoangioblasts. *J Cell Sci* **117**, 4377-4388 (2004).
70. Zebboudj, A. F., Imura, M. & Bostrom, K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* **277**, 4388-4394 (2002).
71. Shanahan, C. M. Mechanisms of vascular calcification in renal disease. *Clin Nephrol* **63**, 146-157 (2005).
72. Steitz, S. A. et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* **89**, 1147-1154 (2001).
73. Speer, M. Y. et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med* **196**, 1047-1055 (2002).
74. Rajamannan, N. M. et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation* **107**, 2181-2184 (2003).
75. Caira, F. C. et al. Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *J Am Coll Cardiol* **47**, 1707-1712 (2006).
76. Mathieu, P. et al. Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis* **14**, 353-357 (2005).
77. Tanimura, A., McGregor, D. H. & Anderson, H. C. Calcification in atherosclerosis. I. Human studies. *J Exp Pathol* **2**, 261-273 (1986).
78. Jian, B. et al. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am J Pathol* **159**, 321-327 (2001).
79. Olsson, M., Rosenqvist, M. & Nilsson, J. Expression of HLA-DR antigen and smooth muscle cell differentiation markers by valvular fibroblasts in degenerative aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* **24**, 1664-1671 (1994).
80. Edep, M. E., Shirani, J., Wolf, P. & Brown, D. L. Matrix metalloproteinase expression in nonrheumatic aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol* **9**, 281-286 (2000).
81. Nilsson, J. Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **27**, 1184-1190 (1993).
82. Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M. & de Crombrughe, B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* **105**, 1039-1045 (1987).
83. Sappino, A. P., Schurch, W. & Gabbiani, G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* **63**, 144-161 (1990).

84. Nagase, H. & Woessner, J. F. J. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**, 21491-21494 (1999).
85. Kaden, J. J. et al. Time-dependent changes in the plasma concentration of matrix metalloproteinase 9 after acute myocardial infarction. *Cardiology* **99**, 140-144 (2003).
86. Elmore, J. R., Keister, B. F., Franklin, D. P., Youkey, J. R. & Carey, D. J. Expression of matrix metalloproteinases and TIMPs in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* **12**, 221-228 (1998).
87. Shah, P. K. Role of inflammation and metalloproteinases in plaque disruption and thrombosis. *Vasc Med* **3**, 199-206 (1998).
88. Soini, Y., Satta, J., Maatta, M. & Autio-Harmainen, H. Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. *J Pathol* **194**, 225-231 (2001).
89. Lee, Y. S. & Chou, Y. Y. Endothelial alterations and senile calcific aortic stenosis: an electron microscopic observation. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* **21**, 137-143 (1997).
90. Helske, S. et al. Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol* **44**, 1859-1866 (2004).
91. Thubrikar, M. J., Aouad, J. & Nolan, S. P. Patterns of calcific deposits in operatively excised stenotic or purely regurgitant aortic valves and their relation to mechanical stress. *Am J Cardiol* **58**, 304-308 (1986).
92. Ghaisas, N. K. et al. Adhesion molecules in nonrheumatic aortic valve disease: endothelial expression, serum levels and effects of valve replacement. *J Am Coll Cardiol* **36**, 2257-2262 (2000).
93. Gearing, A. J. & Newman, W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* **14**, 506-512 (1993).
94. Soini, Y., Salo, T. & Satta, J. Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Hum Pathol* **34**, 756-763 (2003).
95. Fox, S. W. & Chambers, T. J. Interferon-gamma directly inhibits TRANCE-induced osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 868-872 (2000).
96. Takayanagi, H. et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* **408**, 600-605 (2000).
97. Madyastha, P. R., Yang, S., Ries, W. L. & Key, L. L. J. IFN-gamma enhances osteoclast generation in cultures of peripheral blood from osteopetrotic patients and normalizes superoxide production. *J Interferon Cytokine Res* **20**, 645-652 (2000).
98. Vermeire, K. et al. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* **158**, 5507-5513 (1997).
99. Sato, K. et al. Prolonged decrease of serum calcium concentration by murine gamma-interferon in hypercalcemic, human tumor (EC-GI)-bearing nude mice. *Cancer Res* **52**, 444-449 (1992).
100. Key, L. L. J. et al. Long-term treatment of osteopetrosis with recombinant human interferon gamma. *N Engl J Med* **332**, 1594-1599 (1995).
101. Rodriguiz, R. M., Key, L. L. J. & Ries, W. L. Combination macrophage-colony stimulating factor and interferon-gamma administration ameliorates the osteopetrotic condition in microphthalmic (mi/mi) mice. *Pediatr Res* **33**, 384-389 (1993).
102. Gupta, S. et al. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest* **99**, 2752-2761 (1997).
103. Kaden, J. J. et al. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* **170**, 205-211 (2003).
104. Osterud, B. & Bjorklid, E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* **83**, 1069-1112 (2003).
105. Kaden, J. J. et al. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol* **14**, 80-87 (2005).
106. Kovanen, P. T. Role of mast cells in atherosclerosis. *Chem Immunol* **62**, 132-170 (1995).

107. Galli, S. J. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* **62**, 5-33 (1990).
108. Weber, K. T., Swamynathan, S. K., Guntaka, R. V. & Sun, Y. Angiotensin II and extracellular matrix homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 395-403 (1999).
109. O'Brien, K. D. et al. Association of angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma. *Circulation* **106**, 2224-2230 (2002).
110. Helske, S. et al. Possible role for mast cell-derived cathepsin G in the adverse remodelling of stenotic aortic valves. *Eur Heart J* **27**, 1495-1504 (2006).
111. Yoffe, J. R., Taylor, D. J. & Wooley, D. E. Mast cell products stimulate collagenase and prostaglandin E production by cultures of adherent rheumatoid synovial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 270-276 (1984).
112. Yoffe, J. R., Taylor, D. J. & Woolley, D. E. Mast-cell products and heparin stimulate the production of mononuclear-cell factor by cultured human monocyte/macrophages. *Biochem J* **230**, 83-88 (1985).
113. Arend, W. P. & Dayer, J. M. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **38**, 151-160 (1995).
114. Jovinge, S., Ares, M. P., Kallin, B. & Nilsson, J. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 1573-1579 (1996).
115. Hershkoviz, R. et al. Physically damaged extracellular matrix induces TNF-alpha secretion by interacting resting CD4+ T cells and macrophages. *Scand J Immunol* **37**, 111-115 (1993).
116. Galis, Z. S. et al. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* **75**, 181-189 (1994).
117. Galis, Z. S., Muszynski, M., Sukhova, G. K., Simon-Morrissey, E. & Libby, P. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci* **748**, 501-507 (1995).
118. Kaden, J. J. et al. Tumor necrosis factor alpha promotes an osteoblast-like phenotype in human aortic valve myofibroblasts: a potential regulatory mechanism of valvular calcification. *Int J Mol Med* **16**, 869-872 (2005).
119. WS, T. & T, F. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of Pneumococcus. *J Exp Med* **52**, 561-571 (1930).
120. Pepys, M. B. C-reactive protein fifty years on. *Lancet* **1**, 653-657 (1981).
121. Galante, A. et al. C-reactive protein is increased in patients with degenerative aortic valvular stenosis. *J Am Coll Cardiol* **38**, 1078-1082 (2001).
122. Gunduz, H. et al. Can serum lipid and CRP levels predict the "severity" of aortic valve stenosis? *Acta Cardiol* **58**, 321-326 (2003).
123. Sanchez, P. L. et al. Relation of circulating C-reactive protein to progression of aortic valve stenosis. *Am J Cardiol* **97**, 90-93 (2006).
124. Pasceri, V., Cheng, J. S., Willerson, J. T. & Yeh, E. T. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* **103**, 2531-2534 (2001).
125. Pasceri, V., Willerson, J. T. & Yeh, E. T. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* **102**, 2165-2168 (2000).
126. LaRosa, J. C. & Gotto, A. M. J. Past, present, and future standards for management of dyslipidemia. *Am J Med* **116 Suppl 6A**, 3S-8S (2004).
127. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486-2497 (2001).
128. St-Pierre, A. C. et al. Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. *Circulation* **104**, 2295-2299 (2001).

129. Ehara, S. et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* **103**, 1955-1960 (2001).
130. Meisinger, C., Baumert, J., Khuseyinova, N., Loewel, H. & Koenig, W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation* **112**, 651-657 (2005).
131. Holvoet, P. et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 844-848 (2001).
132. Holvoet, P. et al. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes* **53**, 1068-1073 (2004).
133. Toshima, S. et al. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2243-2247 (2000).
134. Suzuki, T. et al. Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease. *Clin Biochem* **35**, 347-353 (2002).
135. Sigurdardottir, V., Fagerberg, B. & Hulthe, J. Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study). *J Intern Med* **252**, 440-447 (2002).
136. Nordin, F. G., Hedblad, B., Berglund, G. & Nilsson, J. Plasma oxidized LDL: a predictor for acute myocardial infarction? *J Intern Med* **253**, 425-429 (2003).
137. Shimada, K. et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* **174**, 343-347 (2004).
138. Wilson, P. W. et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* **97**, 1837-1847 (1998).
139. Despres, J. P. Inflammation and cardiovascular disease: is abdominal obesity the missing link? *Int J Obes Relat Metab Disord* **27 Suppl 3**, S22-4 (2003).
140. Briand, M. et al. Metabolic syndrome negatively influences disease progression and prognosis in aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* **47**, 2229-2236 (2006).
141. Despres, J. P., Lemieux, I., Salomon, H. & Delaval, D. Effects of micronized fenofibrate versus atorvastatin in the treatment of dyslipidaemic patients with low plasma HDL-cholesterol levels: a 12-week randomized trial. *J Intern Med* **251**, 490-499 (2002).
142. Despres, J. P., Lemieux, I. & Robins, S. J. Role of fibric acid derivatives in the management of risk factors for coronary heart disease. *Drugs* **64**, 2177-2198 (2004).
143. Berliner, J. A. et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* **85**, 1260-1266 (1990).
144. Rajavashisth, T. B. et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* **344**, 254-257 (1990).
145. Sarig, S. et al. Detection of cholesterol associated with calcium mineral using confocal fluorescence microscopy. *Lab Invest* **71**, 782-787 (1994).
146. Hirsch, D., Azoury, R., Sarig, S. & Kruth, H. S. Colocalization of cholesterol and hydroxyapatite in human atherosclerotic lesions. *Calcif Tissue Int* **52**, 94-98 (1993).
147. Parhami, F. et al. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 680-687 (1997).
148. Wight, T. N. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* **9**, 1-20 (1989).
149. Olsson, U. et al. Possible functional interactions of apolipoprotein B-100 segments that associate with cell proteoglycans and the ApoB/E receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 149-155 (1997).

150. Bjornheden, T., Babyi, A., Bondjers, G. & Wiklund, O. Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. *Atherosclerosis* **123**, 43-56 (1996).
151. Tribble, D. L., Holl, L. G., Wood, P. D. & Krauss, R. M. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* **93**, 189-199 (1992).
152. Nicholls, S. & Lundman, P. The emerging role of lipoproteins in atherogenesis: beyond LDL cholesterol. *Semin Vasc Med* **4**, 187-195 (2004).
153. Stocker, R. & Keaney, J. F. J. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* **84**, 1381-1478 (2004).
154. Parthasarathy, S., Santanam, N., Ramachandran, S. & Meilhac, O. Oxidants and antioxidants in atherogenesis. An appraisal. *J Lipid Res* **40**, 2143-2157 (1999).
155. Mashima, R., Witting, P. K. & Stocker, R. Oxidants and antioxidants in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **12**, 411-418 (2001).
156. Cushing, S. D. et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5134-5138 (1990).
157. Villa-Colinayo, V., Shi, W., Araujo, J. & Lusis, A. J. Genetics of atherosclerosis: the search for genes acting at the level of the vessel wall. *Curr Atheroscler Rep* **2**, 380-389 (2000).
158. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* **52**, 223-261 (1983).
159. Takei, A., Huang, Y. & Lopes-Virella, M. F. Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. *Atherosclerosis* **154**, 79-86 (2001).
160. Khan, B. V., Parthasarathy, S. S., Alexander, R. W. & Medford, R. M. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **95**, 1262-1270 (1995).
161. Hulthe, J. & Fagerberg, B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1162-1167 (2002).
162. Metso, S. et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein and common carotid artery intima-media thickness in a random sample of middle-aged men. *J Biomed Sci* **11**, 356-361 (2004).
163. Itabe, H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull* **26**, 1-9 (2003).
164. Holvoet, P., Vanhaecke, J., Janssens, S., Van de Werf, F. & Collen, D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* **98**, 1487-1494 (1998).
165. Nishi, K. et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1649-1654 (2002).
166. Ehara, S. et al. Pathophysiological role of oxidized low-density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases. *J Diabetes Complications* **16**, 60-64 (2002).
167. Cominacini, L. et al. Enhanced plasma levels of oxidized low-density lipoprotein increase circulating nuclear factor-kappa B activation in patients with unstable angina. *J Am Coll Cardiol* **46**, 799-806 (2005).
168. von Eckardstein, A., Hersberger, M. & Rohrer, L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **8**, 147-152 (2005).
169. Mackness, M. I., Arrol, S. & Durrington, P. N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* **286**, 152-154 (1991).
170. Oda, M. N. et al. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 921-927 (2002).

171. Aviram, M. et al. Paraonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraonase. *J Clin Invest* **101**, 1581-1590 (1998).
172. Shih, D. M. et al. Mice lacking serum paraonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* **394**, 284-287 (1998).
173. Hyka, N. et al. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood* **97**, 2381-2389 (2001).
174. Calabresi, L. et al. High-density lipoproteins protect isolated rat hearts from ischemia-reperfusion injury by reducing cardiac tumor necrosis factor-alpha content and enhancing prostaglandin release. *Circ Res* **92**, 330-337 (2003).
175. Parhami, F., Basseri, B., Hwang, J., Tintut, Y. & Demer, L. L. High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells. *Circ Res* **91**, 570-576 (2002).
176. Cockerill, G. W., Rye, K. A., Gamble, J. R., Vadas, M. A. & Barter, P. J. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1987-1994 (1995).
177. Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Buring, J. E. & Rifai, N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* **342**, 836-843 (2000).
178. Ridker, P. M., Stampfer, M. J. & Rifai, N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* **285**, 2481-2485 (2001).
179. Wadham, C. et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation* **109**, 2116-2122 (2004).
180. Palta, S., Pai, A. M., Gill, K. S. & Pai, R. G. New insights into the progression of aortic stenosis: implications for secondary prevention. *Circulation* **101**, 2497-2502 (2000).
181. Rallidis, L., Naoumova, R. P., Thompson, G. R. & Nihoyannopoulos, P. Extent and severity of atherosclerotic involvement of the aortic valve and root in familial hypercholesterolaemia. *Heart* **80**, 583-590 (1998).
182. Chui, M. C., Newby, D. E., Panarelli, M., Bloomfield, P. & Boon, N. A. Association between calcific aortic stenosis and hypercholesterolemia: is there a need for a randomized controlled trial of cholesterol-lowering therapy? *Clin Cardiol* **24**, 52-55 (2001).
183. Rajamannan, N. M. Calcific aortic stenosis: a disease ready for prime time. *Circulation* **114**, 2007-2009 (2006).
184. Drolet, M. C., Roussel, E., Deshaies, Y., Couet, J. & Arsenault, M. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *J Am Coll Cardiol* **47**, 850-855 (2006).
185. Galassi, A., Reynolds, K. & He, J. Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am J Med* **119**, 812-819 (2006).
186. Demer, L. L. Vascular calcification and osteoporosis: inflammatory responses to oxidized lipids. *Int J Epidemiol* **31**, 737-741 (2002).
187. Yla-Herttuala, S. et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* **84**, 1086-1095 (1989).
188. Kontush, A., Chantepie, S. & Chapman, M. J. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1881-1888 (2003).
189. Fraley, A. E. & Tsimikas, S. Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* **17**, 502-509 (2006).
190. Holvoet, P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol* **59**, 479-484 (2004).