

Université de Montréal

Étude d'un modèle murin de vieillissement sur la sténose valvulaire aortique

par

Juliette Trapeaux

Département de médecine

Faculté de médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en Sciences biomédicales

Décembre, 2009

© Juliette Trapeaux, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude d'un modèle murin de vieillissement sur la sténose valvulaire aortique

présenté par :

Juliette Trapeaux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric Thorin, président-rapporteur

Dr Jean-Claude Tardif, directeur de recherche

Dr Éric Rhéaume, co-directeur

Dr Alain Rivard, membre du jury

RÉSUMÉ

La sténose valvulaire aortique (SVA) est une pathologie associée au vieillissement et aux facteurs de risque cardiovasculaire. Afin d'étudier la SVA et d'explorer de nouvelles thérapies, plusieurs modèles animaux ont été récemment développés, mais la plupart de ces modèles ciblent les mécanismes de développement de la SVA reliés à l'hypercholestérolémie. Le syndrome de Werner (WS) est une maladie caractérisée par un vieillissement prématuré. Récemment, il a été découvert que des souris mutantes ayant une délétion du domaine hélicase du gène Werner, responsable du WS, démontraient un profil hémodynamique typique de la SVA. De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que ces souris pourraient développer une SVA plus rapidement que des souris de type sauvage. Nous avons donc étudié les effets de cette mutation chez des souris $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$, en comparant le taux de progression d'une SVA entre des souris $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ ($Wrn\Delta hel$) et des souris de type sauvage comme groupe contrôle. À la suite d'une diète riche en sucre et en gras sur une période de 24 semaines, les souris $Wrn\Delta hel$ ont démontré une diminution plus prononcée de leur aire de valve aortique (mesures échocardiographiques) que les souris contrôles, supportée par les analyses histologiques concernant la fibrose des valves aortiques. Les souris n'ont toutefois développé aucun signe évident d'athérosclérose comme l'infiltration de lipides ou l'inflammation, bien que certaines caractéristiques liées à la dysfonction endothéliale semblent être augmentées chez les souris $Wrn\Delta hel$. D'autres mesures échocardiographiques indiquant une SVA, comme une hypertrophie du ventricule gauche dans le groupe $Wrn\Delta hel$, ont été obtenues. Nous avons aussi observé des indices de vieillissement plus marqués quant aux analyses sanguines et de la moelle osseuse des souris $Wrn\Delta hel$ en comparaison avec les souris contrôles. Par conséquent, ce modèle expérimental de vieillissement pourrait être utilisé pour les études futures sur la SVA sans les principaux effets athérogéniques des autres modèles expérimentaux.

Mots clés: Vieillissement, syndrome de Werner; souris $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$, maladies cardiovasculaires, sténose valvulaire aortique

ABSTRACT

Aortic valve stenosis (AVS) is associated with aging and classical cardiovascular risk factors. Different animal models were recently developed to study AVS and explore new therapies, however, most of these models rely almost exclusively on hypercholesterolemia-related mechanisms for AVS development. Werner syndrome (WS) is a disorder characterized by premature aging. It was recently demonstrated that mutant mice with a deletion of the helicase domain of the Werner gene, the gene responsible for WS, showed hemodynamic profile typical of AVS. We therefore hypothesized that mice with the $Wrn^{\Delta hel}$ deletion could develop AVS earlier than wild-type (WT) mice. We studied the effect of the $Wrn^{\Delta hel}$ mutation by comparing the rate of progression of AVS in homozygous mutant versus WT mice. By twenty-four weeks on a high-fat/high-carbohydrate diet, $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ ($Wrn^{\Delta hel}$) mice showed a stronger decrease of the aortic valve area measured by serial echocardiography than WT mice, supported by histological analyses of valve fibrosis but without developing major signs of atherosclerosis such as lipid infiltration or increased inflammation. Some features linked to endothelial dysfunction also appeared to be increased in $Wrn^{\Delta hel}$ mice. Other echocardiographic measurements were typical of AVS, such as left ventricle hypertrophy in the $Wrn^{\Delta hel}$ group. We also observed stronger aging properties from $Wrn^{\Delta hel}$ mice bone marrow and blood analyses compared to the WT group. Consequently, this experimental aging model could be used for AVS research without the major confounding atherogenic effects of other experimental models.

Key words: Aging, Werner syndrome; $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ Mouse; Cardiovascular disease, Aortic valve stenosis

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	x
Liste de sigles et abréviations.....	xi
Remerciements	xiv
Introduction	1
A. Athérosclérose	1
A.1. Étiologie	1
A.2. Évolution	1
A.3. Pathologies associées.....	3
B. Sténose valvulaire aortique	4
B.1. Étiologie.....	4
B.2. Évolution.....	5
C. Dysfonction endothéliale.....	9
C.1. Fonction endothéliale.....	9
C.2. Mécanismes de la dysfonction endothéliale	10
C.3. Influence sur les pathologies vasculaires.....	11
D. Vieillessement et pathologie cardiovasculaire	12
D.1. Réparation cellulaire et fibrose.....	12
D.2. Syndrome de Werner	14

D.3. Sénescence et cellules souches.....	15
E. Lipides et pathologie cardiovasculaire.....	16
E.1. Gestion des lipides circulants.....	16
E.2. Influence sur la progression de l'athérosclérose.....	17
E.3. Traitement.....	18
F. Étude sur la progression de la SVA.....	19
F.1. Modèle animal.....	19
F.2. Diète.....	19
F.3. Effet du vieillissement.....	20
G. Hypothèse et buts.....	21
Méthodes détaillées.....	22
H. Stratégie de l'approche expérimentale.....	22
I. Modèle animaux et méthodes expérimentales.....	23
J. Échocardiographie.....	23
J.1. Morphologie de la valve aortique.....	24
J.2. Étude d'élasticité de la racine aortique.....	24
K. Analyses sanguine.....	24
K.1. Compte cellulaire sanguin.....	25
K.2. Analyse biochimique.....	25
K.3. Marqueurs d'inflammation.....	25
K.4. Dosage du NO.....	26
L. Analyse de la moelle osseuse.....	26
L.1. Isolation de la moelle osseuse.....	26
L.2. Tests de prolifération des progéniteurs.....	27

L.3. Caractérisation des cellules de la moelle osseuse	27
M. Histologie	29
N. Histochimie	29
N.1. Colorations courantes	29
N.2. Immunohistochimie	30
N.3. Analyses des colorations et marquages	30
O. Analyses statistiques.....	31
Contribution de l'étudiante.....	33
Characterization of $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice as an aging model for aortic valve stenosis.....	34
P. Abstract	35
Q. Introduction	36
R. Materials and methods.....	38
R.1. Animals and experimental protocol.....	38
R.2. Echocardiography	38
R.3. Blood analysis.....	39
R.4. Bone marrow cells analysis	39
R.5. Histology.....	41
R.6. Statistical analysis.....	42
S. Results	44
S.1. Bone marrow and red blood cells analysis.....	44
S.2. Weight, lipid profile and glycemia.....	44
S.3. The progression of AVS and cardiac remodeling: Echocardiographic measurements	45
S.4. Study on aortic elasticity: Echocardiographic measurements.....	49

S.5. Assessment of atherosclerosis and fibrosis in the aortas and aortic valves	.51
S.6. Inflammation and evaluation of valvular endothelium integrity54
T. Discussion57
T.1. AVS characteristics in homozygous <i>WrnΔhel</i> mutant mice under high-fat/high-carbohydrate diet57
T.2. Low level of atherosclerosis in <i>WrnΔhel</i> mutant mice58
T.3. Aging-related observations in relation to development of mild AVS in <i>WrnΔhel</i> mutant mice59
T.4. Study limitations62
U. References63
Discussion66
V. Signes d'une SVA légère chez les souris mutantes <i>WrnΔhel</i>66
W. Absence de signes athérogéniques évidents chez les souris mutantes <i>WrnΔhel</i>67
X. Observations concernant le vieillissement supportant les signes de SVA chez les souris mutantes <i>WrnΔhel</i>68
Y. Limitations de l'étude73
Z. Perspectives expérimentales73
Bibliographie75

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Bone marrow progenitor cell counts	46
Table 2. Weight, plasma lipid profile and glycemia	46
Table 3. Inflammation parameters from blood analysis.....	54

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation des voies potentielle menant aux pathologies valvulaires	6
Figure 2. Représentation schématique de la synthèse du NO	11
Figure 3. Cadre de délétion du gène WRN chez la souris.....	20
Figure 4. Aortic valve area (AVA) values obtained by echocardiography during the high-fat/high carbohydrate diet period	47
Figure 5. Echocardiographic measurements for cardiac remodeling	48
Figure 6. Correlation between the decrease of AVA and change of LVFS	49
Figure 7. Echocardiographic measurements of aortic root elasticity	50
Figure 8. Aortic valve leaflet cross sections for Sirius red staining.....	52
Figure 9. Correlation between the average of central third aortic valve leaflet type III collagen staining area/ROI and aortic valve leaflet maximal thickness.....	53
Figure 10. Correlation between the change over 24 weeks of HFHC diet of AVA and a) PCT blood level or b) aortic valve leaflet eNOS area/ROI.....	55
Figure 11. Immunohistochemical detection of eNOS in aortic valve leaflet cross sections	56

LISTE DE SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ABCA1 : transporteur ABC de type I liant l'ATP
ANCOVA : analyse de covariance
ApoA-I : apolipoprotéine A-I
aS : tension aortique
Ath-1 : gène de susceptibilité à l'athérosclérose
AV : valve aortique
AVA : aire de la valve aortique
AVAi : AVA indexé au poids
AVS : *aortic valve stenosis*
BFU-E : unité formatrice de bourgeon érythroïde
BH2 : dihydrobioptérine
BH4 : tétrahydrobioptérine
BW : poids corporel
CAD : maladie coronarienne athérosclérotique
CSA_{LVOT} : l'aire transversale du LVOT
CETP : protéine de transfert du cholestérol estérifié
CFU-F : unité formatrice de colonie fibroblastique
CFU-G : unité formatrice de colonie granulocyte
CFU-GEMM : unité formatrice de colonie myéloïde
CFU-GM : unité formatrice de colonie granulocyte/monocyte
CFU-M : unité formatrice de colonie macrophage
eNOS : oxyde nitrique synthétase endothéliale
FACS : cytométrie de flux en fluorescence
FBS : sérum bovin fœtal
FS : % de raccourcissement
GM-CSF : facteurs de stimulation de colonie des granulocytes/macrophages
GRA : granulocyte
HClO⁻ : ion oxyacide

HCT : hématocrite
HDL : lipoprotéine à haute densité
HF/HC : *high-fat/high-carbohydrate*
HGB : hémoglobine
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HW : poids du cœur
ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire 1
IL : interleukine
iNOS : oxyde nitrique synthétase inductible
KSL : lignée cellulaire c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻
LCAT : lécithine cholestérol acyle transférase
LDL : lipoprotéine de basse densité
LDLR : récepteur de lipoprotéine à basses densité
LV : ventricule gauche
LVAW : paroi antérieure du ventricule gauche
LVDd : dimension du ventricule gauche en diastole
LVDs : dimension du ventricule gauche en systole
LVFS : fraction d'éjection du ventricule gauche
LVmass : masse du ventricule
LVOT : dimension de l'écoulement du ventricule gauche
LVPW : paroi postérieure du ventricule gauche
LYM : lymphocyte
MCP-1 : peptide chimiottractant de monocyte 1
M-CSF : facteur de stimulation de colonie des macrophages
MMP : matrice métalloprotéinase
MNC : cellules mononucléées
MON : monocyte
MSC : cellule souche mésenchymale
NADPH : nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate
nNOS : oxyde nitrique synthétase neuronale
NO : oxyde nitrique

NOS : oxyde nitrique synthétase
O₂⁻ : anion superoxyde
ONOO⁻ : peroxydinitrite
ORO : Oil red O
oxyLDL : LDL oxydées
PCT : plaquettecrite (plateletcrit)
PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes
PE : phycoérythrine
PLT : plaquette
PPAR : *peroxisome proliferating activator receptor*
p-VASP : VASP phosphorylé
PWV : vitesse de la paroi postérieure
RBC : érythrocyte
RCT : transport à rebours du cholestérol
ROI : région d'intérêt
SI : indice de rigidité
SOD2 : superoxyde dismutase mitochondriale
SR-BI : récepteur scavenger BI
SVA : sténose valvulaire aortique
TGF : facteur de croissance transformant
VCAM : molécule d'adhésion de cellules vasculaires
VG : ventricule gauche
VIT_{LVOT} : Vitesse temps-intégral LVOT
VIT_{AO} : Vitesse temps-intégral de la valve aortique
VLDL : lipoprotéine à très basses densité
WBC : leucocyte
WRN : Werner
WRNp : protéine de Werner
WS : syndrome de Werner
WT : souche de type sauvage

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs de recherche, Docteur Éric Rhéaume et Docteur Jean-Claude Tardif pour leur soutien et pour avoir rendu cette étude possible. Leur intérêt pour ce projet m'a aidé à comprendre et maîtriser le domaine de la recherche fondamentale. Ce projet m'a permis de développer mes connaissances et mon esprit scientifique.

Je remercie Mélanie Mecteau pour son aide et son enseignement pour la manipulation des souris ainsi que pour l'histologie et l'histochimie. Pour m'avoir grandement aidée dans l'analyse des données échocardiographiques, merci au Docteur Yan Fen Shi. Merci à Francine Poulin pour avoir fait les prises de données échocardiographiques. Pour avoir fait toutes mes analyses statistiques et pour m'avoir aidée à les comprendre, je remercie Mariève Cossette. Pour m'avoir permis d'élargir mes connaissances techniques en culture cellulaire et en cytométrie, merci à Geneviève Brand et à Anne-Elen Kernaleguen. Je voudrais remercier aussi l'équipe du Docteur Théroix pour leur soutien technique.

Finalement, je suis très reconnaissante envers l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil et leur encouragement au cours de ma maîtrise et envers plusieurs personnes travaillant à l'Institut de Cardiologie de Montréal pour avoir répondu à mes interrogations, particulièrement à Catherine Martel qui fut d'un grand soutien moral et un exemple de persévérance.

INTRODUCTION

A. ATHÉROSCLÉROSE

A.1. Étiologie

L'athérosclérose, une maladie multifactorielle complexe dont le processus dégénératif est progressif, est une des premières causes de morbidité et mortalité affectant la population occidentale. Les facteurs de risque associés à cette pathologie se divisent en trois groupes : définitivement modifiable, potentiellement modifiable et non modifiable. Le premier groupe de facteurs de risque est surtout axé sur le style de vie des personnes et peuvent être contrôlés : soit le cholestérol, la pression artérielle, la cigarette, le diabète, l'obésité, la sédentarité, le stress et l'abus d'alcool. La lipoprotéine (a), l'oxydation des lipides, l'intolérance au glucose, l'hypertrophie ventriculaire et les facteurs hématologiques comme l'inflammation (facteurs de risque appartenant au deuxième groupe) deviennent de plus en plus une cible potentielle pour de nouvelles mesures préventives contre l'athérogénèse. Par contre, le sexe, l'âge et l'historique familial sont des facteurs incontrôlables qui expliquent pourquoi certaines personnes sont plus à risque que d'autres à développer des maladies cardiovasculaires (Wilson, 2004).

A.2. Évolution

L'athérosclérose se développe vers la fin de l'adolescence mais les séquelles cliniques n'apparaissent en général qu'après 45 ans (Wilson, 2004). Il s'agit, en premier lieu, d'infiltration passive de lipoprotéines de basses densité (LDLs) au niveau de l'intima artérielle, sous l'endothélium (Artigou et al., 2007; Zipes et al., 2005). Cette infiltration est corrélée à la concentration sanguine de LDLs. Les LDLs, retenues par les protéoglycans de l'intima, subissent des modifications comme

l'oxydation, ce qui entraîne l'élaboration local de cytokines (interleukine 1 ou IL-1) par les leucocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Chi et al., 2004) résidants dans l'intima.

Ensuite, la présence de ces cytokines augmente la production de chimiokines (monocyte chemoattractic peptid 1 ou MCP-1) sécrétées par les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Harrington, 2000), ainsi que de molécules d'adhésion de l'endothélium (molécules d'adhésion des cellules vasculaires 1 ou VCAM-1, E-selectin et P-selectin) qui permettent aux monocytes circulant de traverser la barrière endothéliale de l'artère par diapédèse. Le facteur de stimulation de colonie des macrophages (M-CSF) produit par les cellules musculaires lisses (Kleemann et al., 2008) active la différenciation des monocytes en macrophages (Suzu et al., 2007; Zhao et al., 2006) et fait augmenter l'expression de récepteurs « scavengers » des macrophages, ce qui leur permet de capturer les LDLs oxydées (oxyLDLs) et de devenir des cellules spumeuses.

Entre temps, la présence de M-CSF et de facteurs de stimulation de colonie des granulocytes/macrophages (GM-CSF) favorisent la prolifération des macrophages dans l'intima qui entretiendront une réaction inflammatoire chronique responsable du développement de la plaque. En effet, les cellules spumeuses sont une source de médiateurs (métalloprotéinase matricielle ou MMP, O_2^- , $HClO^-$, facteur de croissance dérivé des plaquettes ou PDGF) qui entraînent la dysfonction endothéliale, le recrutement et l'accumulation de leucocytes ainsi que la migration des cellules musculaires lisses de la média à l'intima. Les cellules musculaires lisses présentes dans l'intima élaborent de la matrice extracellulaire qui s'accumule au file du temps et fait grossir la plaque athéromateuse (fibrose). Lorsque la plaque devient trop dense suite à l'accumulation de cellules musculaires lisses, de cellules spumeuses et de matrice extracellulaire, il apparaît de l'apoptose cellulaire et parfois de la calcification vasculaire (Micheletti et al., 2008) qui forment un cœur lipidique dans la plaque.

À un stade avancé, une plaque athéromateuse est composée d'une chape fibromusculaire qui isole le cœur lipidique de la lumière du vaisseau et dont son intégrité détermine la stabilité de la plaque. La progression de la plaque entraîne un remodelage vasculaire, un mécanisme compensatoire pour maintenir un flux sanguin normal (Korshunov et al., 2007; Kuhn et al., 2007). Lorsque la sévérité de la plaque est trop importante, une réduction de la lumière de l'artère s'en suit (Zipes et al., 2005). S'il advient une rupture ou une érosion de la plaque, mettant le contenu du cœur lipidique en contact avec le sang, le phénomène de thrombose survient impliquant les plaquettes, puis le système de coagulation, pour finalement mener souvent à l'obstruction de l'artère (Artigou et al., 2007). Le résultat peut aller de l'infarctus du myocarde à l'accident cérébro-vasculaire, dépendamment de la localisation de la plaque.

A.3. Pathologies associées

Tel que mentionné plus haut, l'athérosclérose étant une maladie multifactorielle, les nombreuses causes de l'athérosclérose interagissent entre elles et déterminent la progression de la plaque. Dans des conditions physiologiques, l'endothélium permet difficilement aux leucocytes de traverser la barrière endothéliale, contraignant ceux-ci à la lumière des artères (Zipes et al., 2005). Cependant, lors de dommages tissulaires, les cellules endothéliales locales émettent un signal qui permet aux leucocytes de se rendre au site de lésion sous l'endothélium via des cytokines et chimiokines (comme IL-1 et MCP-1 produites lors de l'initiation de l'athérosclérose) et par l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Par ce processus, appelé l'inflammation, l'organisme peut normalement séquestrer et éliminer le tissu lésé pour le remplacer par un tissu sain (Ruberg and Loscalzo, 2004). Cependant, au cours de l'athérosclérose, il n'y a pas de résolution de l'inflammation. Donc, l'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique puisque l'inflammation intervient tout au long de la progression de l'athérome : l'inflammation est impliqué lors de la formation initiale de plaque suite à l'accumulation de lipoprotéines de faible densité sous l'endothélium, lors de la

progression des lésions intermédiaires et dans la déstabilisation des plaques avancées (Ruberg and Loscalzo, 2004; Spagnoli et al., 2007). Évidemment, d'autres sources d'inflammation, comme les infections, peuvent également accélérer la progression de l'athérosclérose (Stassen et al., 2008). De même, la dysfonction endothéliale (ou la perte des fonctions de l'endothélium normalement impliquées dans la régulation de l'inflammation, le tonus vasculaire et la coagulation) est une des causes de la croissance des plaques athéromateuses. En effet, la dysfonction endothéliale, causée par des facteurs de risques similaires à ceux associés à l'athérosclérose (hypertension, vieillissement, dyslipidémie, inflammation/ infection, diabète, tabagisme...), entraîne une vasoconstriction des artères, l'inflammation, la thrombose et une prolifération anormale des cellules musculaires lisses (Hamburg and Vita, 2004). De plus, certaines des causes de l'athérosclérose, comme le diabète de type II, sont associées à l'hypertension. L'hypertension entraîne alors la progression de l'athérosclérose (Handy and Gavras, 2004), bien que la relation entre ces deux pathologies distinctes ne soit pas exclusive (Alexander, 1995). L'hypertension, le diabète de type 2, la dyslipidémie et l'obésité viscérale sont des désordres métaboliques qui sont reliés au syndrome métabolique (Watanabe et al., 2008), pathologie associée à la résistance à l'insuline et précurseur des maladies cardiovasculaires. En effet, l'hyperglycémie, causée par la résistance à l'insuline, entraîne une série d'évènement comme le stress oxydatif induisant la dysfonction endothéliale (Panzer et al., 2004). Ainsi, comme nous pouvons le constater, l'athérosclérose et ses causes interagissent et engendrent plusieurs complications pathologiques.

B. STÉNOSE VALVULAIRE AORTIQUE

B.1. Étiologie

La sténose valvulaire aortique (SVA), la lésion valvulaire la plus commune en Amérique du Nord et en Europe (Rajamannan et al., 2007; Ramaraj and Sorrell, 2008), est également une pathologie progressive et dégénérative caractérisée par un

épaississement des feuillets de la valve aortique. La bicuspidie congénitale, les maladies rhumatismales et la calcification de valve normalement constituée de trois feuillets (forme la plus commune) sont les trois principales causes de la SVA.(Carabello and Paulus, 2009). Pour la forme la plus commune de la SVA, les facteurs de risque associés à cette valvulopathie sont similaires à ceux menant à l'athérosclérose : l'âge, l'inflammation, l'hypertension, l'hyperlipidémie, le tabagisme, le genre et le diabète de type 2. Par contre, les deux derniers facteurs de risque n'ont pas autant d'impact dans la progression de la SVA que celle de l'athérosclérose (Freeman and Otto, 2005). D'autres facteurs de risque tel que l'insuffisance rénale chronique, les maladies coronariennes et l'hyperparathyroïdie sont aussi responsables de la progression de la SVA (Cowell et al., 2004; Ramaraj and Sorrell, 2008).

B.2. Évolution

Auparavant, on pensait que la SVA, avec l'âge, était causée par une séquence de déchirures et réparations (« wear-and-tear ») chroniques de l'endothélium des feuillets, suivit d'un dépôt passif de calcium sous-endothélial. Cependant, il a été rapporté qu'à l'instar de l'athérosclérose, il s'agissait davantage d'un processus inflammatoire récurant avec dépôts lipidiques accompagnés d'une calcification active microscopique des feuillets (Branch et al., 2002; Freeman and Otto, 2005; Helske et al., 2007), comme représenté à la Figure 1.

L'étape préliminaire de la SVA débute par une lésion sous-endothéliale localisée dans la partie *fibrosa* du feuillet, soit du côté aortique de la valve. Cette lésion est initiée par une rupture de l'endothélium causé par un stress mécanique qui permet aux lipides circulants de s'immiscer dans le tissu valvulaire et de s'y accumuler. Par la suite, l'oxydation des LDLs et la lésion endothéliale entraînent une réponse inflammatoire recrutant monocytes et lymphocytes T activant l'expression par les cellules endothéliales de E-selectine ainsi que de la molécule d'adhésion

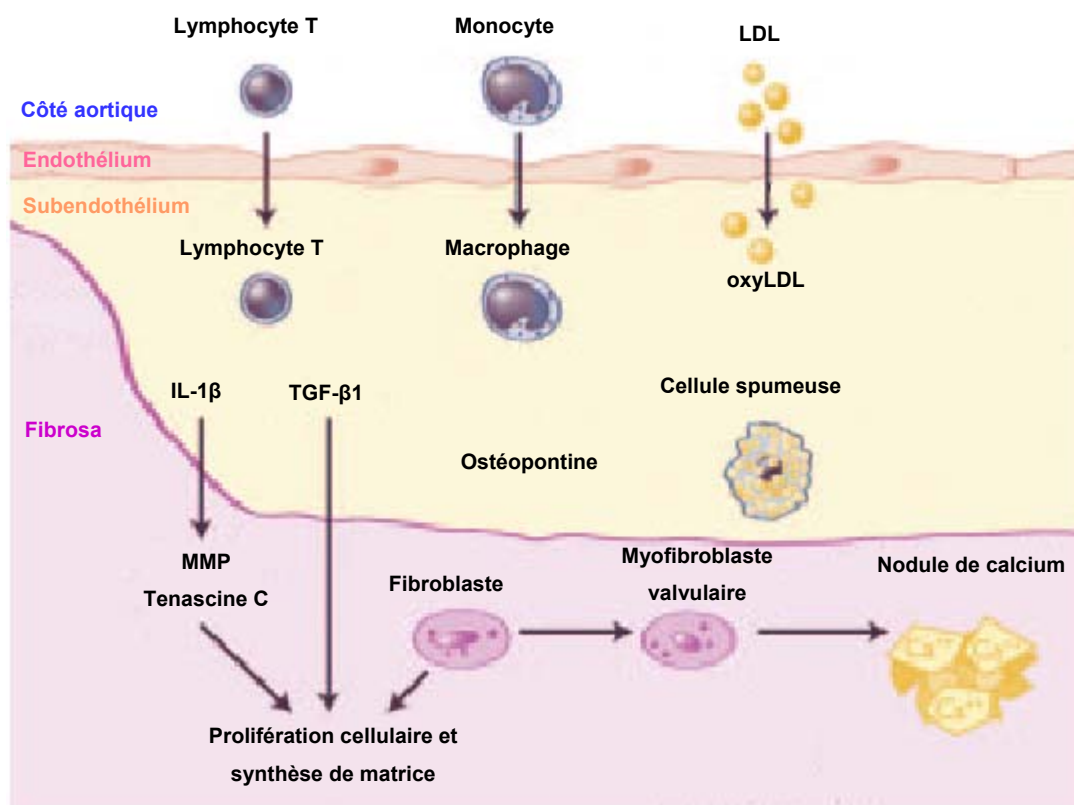


Figure 1. Représentation des voies potentielle menant aux pathologies valvulaires. Les lymphocytes T et les macrophages infiltrent l'endothélium et relâchent des cytokines qui agissent sur les fibroblastes valvulaires pour promouvoir la prolifération cellulaire et le remodelage de la matrice extracellulaire. Une partie des fibroblastes, qui se trouvent dans la *fibrosa*, se différencient en myofibroblastes dont certains acquièrent un phénotype ostéoblastique, capables de former des nodules de calcium. Adapté de Freeman RV and Otto CM (2005) *Circulation* 111: 3316–3326.

intercellulaire 1 (ICAM-1) et de VCAM-1. Une fois recrutés, les monocytes, qui se différencient en macrophages, et les lymphocytes T relâchent dans la *fibrosa* des cytokines, comme le facteur de croissance transformant β 1 (TGF- β 1) et IL-1 β , qui augmentent la production de MMPs. Les MMPs sont des enzymes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire et du remodelage de tissus lésés ainsi que de la calcification locale. Cette calcification, qui peut être aussi induite par les produits de dégradations cellulaires suivant l'apoptose au niveau de la lésion ou par les

oxyLDLs, est relative à la présence de cellules ayant un phénotype ostéoblastique et qui sont possiblement dérivées de cellules souches mésenchymales (MSCs) circulantes (Cowell et al., 2004; Freeman and Otto, 2005). Ces MSCs seraient sujettes à une mauvaise différenciation due à leur sénescence ou à leur microenvironnement altéré de sorte que les signaux de différenciation soient biaisés.

Bien que la SVA soit associée à l'athérosclérose (Helske et al., 2007; Kuusisto et al., 2005), plusieurs différences distinguent ces deux pathologies. Dans une plaque athéromateuse, les cellules présentes en plus grand nombre sont les cellules musculaires lisses ainsi que les cellules spumeuses, alors que dans les feuillets d'une valve sténosée, ces types cellulaires manquent et les fibroblastes ainsi que les myofibroblastes dominant. Également, la calcification peut être présente dans l'athérome à un stade avancé, néanmoins elle est davantage proéminente et précoce dans la SVA. Ainsi, contrairement à l'athérosclérose dont les événements cliniques sont plus aigus (thrombose relié à la rupture de plaques), la sténose valvulaire aortique présente des symptômes davantage progressifs reliés à l'épaississement graduel des feuillets et une obstruction croissante de l'aire d'ouverture de la valve (Cowell et al., 2004; Freeman and Otto, 2005). Bien que l'athérosclérose et la SVA aient beaucoup de point en commun, il s'agit tout de même de pathologies cardiovasculaires distinctes.

B.3. Symptômes et pathophysiologie

Les signes cliniques les plus communs chez les patients diagnostiqués avec une SVA sont la fatigue, une diminution de la tolérance à l'exercice ou une dyspnée à l'effort. Ces symptômes apparaissent relativement tard chez les individus souffrants de SVA. En effet, la progression de cette pathologie débute par une longue période latente asymptomatique durant laquelle une diminution de l'aire valvulaire et une surcharge du myocarde s'établissent. L'apparition de symptômes plus graves, comme l'angine de poitrine, la syncope et l'insuffisance cardiaque, demeure un tournant

majeur de l'évolution de la SVA, traduit par le déclin brusque de la survie des patients. (Boudoulas, 2003; Carabello and Paulus, 2009; Libby et al., 2008).

Chez ces patients, le VG génère une pression élevée pour éjecter le sang afin de surmonter la postcharge accrue dû à la SVA. En effet, une obstruction de la chambre de chasse du VG entraîne une augmentation de la pression diastolique et systolique du VG, une augmentation du temps d'éjection du VG et une diminution de la pression aortique. L'augmentation de la pression systolique accompagnée d'une augmentation de la surcharge volumique du VG accroît la masse de celui-ci, pouvant mener à sa dysfonction. Aussi, avec l'augmentation de temps d'éjection du VG, l'évolution de ces paramètres entraîne une augmentation de la consommation en O₂ du VG, pouvant provoquer une ischémie du myocarde. L'augmentation du temps d'éjection du VG entraînant une diminution du temps diastolique, l'augmentation de la pression diastolique du VG et la diminution de la pression aortique induisent une baisse de la réserve en O₂ du myocarde pouvant mener également à une ischémie. Ainsi, les altérations de tous ces paramètres causées par une SVA peuvent induire une défaillance du VG. Plus la sténose aortique est sévère, plus le gradient est élevé entre les pressions systoliques du VG et de l'aorte. En raison de l'augmentation des pressions générées par le VG, son myocarde subit une hypertrophie, plus fréquemment observée comme étant concentrique, traduit par un épaissement de la paroi du VG et une augmentation de sa masse.(Carabello and Paulus, 2009; Libby et al., 2008)

B.4. Évaluation diagnostique et traitement

L'échocardiographie en deux dimensions avec une évaluation Doppler constitue le pilier du diagnostic de la SVA. Cette étude évalue la fonction du VG (mesure de la vitesse du jet aortique), l'étendue de l'hypertrophie, la quantité de calcification valvulaire, le gradient de pression transvalvulaire et l'aire de la valve aortique. Une bonne étude fournira toutes les données nécessaires pour évaluer la sévérité de la sténose et ses effets sur le ventricule gauche. Entre autre, une aire

valvulaire aortique de moins de 1 cm² et un gradient transvalvulaire moyen excédant 40-50 mmHg sont des indices de SVA sévère. Toutefois, lorsque l'historique du patient, l'examen physique et les mesures échocardiographiques sont incohérents et laissent un doute sur la sévérité de la SVA, une étude hémodynamique invasive reste la méthode de référence du diagnostic (Feigenbaum et al., 2005; Otto, 2009; Solomon et al., 2007).

À ce jour, le remplacement de la valve aortique demeure le traitement le plus efficace pour une SVA sévère. Il s'agit souvent d'une opération à cœur ouvert. Cependant, la SVA étant reliée au vieillissement, comme plusieurs autres maladies, les patients âgés ont souvent des troubles concomitants qui affectent le pronostic ainsi que la réadaptation ou survie postopératoire. Toutefois, des approches médicales en vue de retarder la progression à un stade moins sévère de la SVA font l'objet d'études. Entre autre, des études ont démontré que l'utilisation des statines, médication normalement prescrit aux personnes souffrant d'athérosclérose, permettrait de ralentir la progression de la SVA chez des patients dont le niveau de LDLs est élevé. Aussi, l'installation de dispositifs par voie percutanée demeure une méthode prometteuse pour effectuer des remplacements de valve de façon moins invasive (Carabello and Paulus, 2009).

C. DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE

C.1. Fonction endothéliale

L'oxyde nitrique (NO[•]), un des principaux responsables de l'homéostasie vasculaire, participe aux fonctions métaboliques et régulatrices tel que la fibrinolyse, l'interaction des plaquettes et des leucocytes au niveau des parois artérielles ainsi que la régulation du tonus vasculaire et de la pression sanguine, entre autres. Il joue aussi un rôle protecteur en contrôlant la prolifération des cellules musculaires lisses dans plusieurs conditions pathologiques comme l'athérosclérose. (Higashi et al., 2009) Le

NO \cdot , ayant une courte demi-vie, est produit par une synthétase d'oxyde nitrique (NOS) utilisant le substrat L-arginine et des cofacteurs comme la nicotinamide- adénine-dinucléotide phosphate (NADPH), la flavine adénine dinucléotide, la flavine mononucléotide et le tétrahydrobioptérine (BH $_4$). Cette dernière est une molécule critique au fonctionnement des NOS au niveau de l'endothélium. Il existe trois isoformes de NOS. La NOS neuronale (nNOS) et la NOS endothéliale (eNOS) sont régulées par le calcium, la calmoduline et certaines modifications post-traductionnelles. La NOS inductible (iNOS), quand à elle, est régulée via une stimulation engendrée par des cytokines et produit plus de NO \cdot que les deux premiers isoformes.(Napoli et al., 2006)

Les cellules endothéliales expriment la eNOS (isoforme vasculaire prédominant produit constitutivement) qui génère une molécule vasoprotectrice, le NO \cdot . La barrière endothéliale, en réponse aux facteurs de risques, maintient la production de NO \cdot pour préserver une protection vasculaire.(Chatterjee and Catravas, 2008; Förstermann and Münzel, 2006) Les mécanismes et composés qui régissent l'expression d'eNOS sont contrôlés autant par des stimuli physiques comme la force de cisaillement (« shear stress »), que par des facteurs de croissances, hormones ou par le NO \cdot lui-même.(Li et al., 2002a).

C.2. Mécanismes de la dysfonction endothéliale

La réduction de biodisponibilité du NO \cdot est considérée comme un des facteurs les plus important associés aux maladies vasculaires. Par contre, on ne peut encore déterminer si la dysfonction endothéliale en est la cause ou le résultat. Plusieurs facteurs affectant la production de NO \cdot et sa biodisponibilité aux cellules cibles se rapportent avant tout à la fonction des NOS et la disponibilité de ses substrats et cofacteurs. (Chatterjee and Catravas, 2008)

Le stress oxydant joue un rôle majeur dans le développement de la dysfonction endothéliale, de manières directe et indirecte. L'oxydation des LDLs

déclenche le mécanisme de la dysfonction endothéliale indirectement, engendrant une toxicité pour les cellules endothéliales et en permettant l'adhésion et la migration des cellules leucocytaires dans l'espace sous-endothéliale (Schulz et al., 2004). De manière plus directe, la présence d'anion superoxyde (O_2^-), produit par les facteurs de risque et entraînant un stress oxydant, réagit avec le $NO\cdot$ pour former du peroxyde nitrite ($ONOO^-$). Le cofacteur BH_4 est très sensible à l'oxydation causée par l' $ONOO^-$ et se transforme en BH_2 et en bioptérine. La réduction de la biodisponibilité du BH_4 entraîne alors une production de O_2^- par l'eNOS (mécanisme de l'eNOS non-couplé) (Chatterjee and Catravas, 2008; Förstermann and Münzel, 2006; Napoli et al., 2006) (Figure 2).

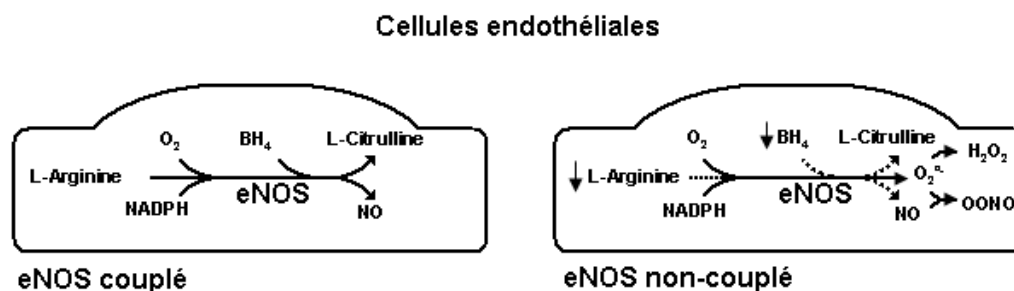


Figure 2. Représentation schématique de la synthèse du $NO\cdot$ selon le fait que l'eNOS soit couplé ou non. Adapté de Katusic ZS (2001) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H981–H986.

C.3. Influence sur les pathologies vasculaires

Les pathologies vasculaires associées à la dysfonction endothéliale sont souvent accompagnées d'un changement dans l'expression d'eNOS. Une sous-expression de cette dernière a été observée dans les cas d'athérosclérose ou d'hypertension sévère. Cependant, sous certaines conditions comme l'inflammation, l'endothélium produit du $NO\cdot$ en excès via l'iNOS. Aussi, dans la plupart des cas de pathologies cardiovasculaires, par certains mécanismes de régulation, l'expression d'eNOS est augmentée. Dans ces cas, sa surexpression devient dysfonctionnelle et

produit plus de $O_2^{\cdot-}$ que de NO^{\cdot} via le eNOS non-couplé.(Chatterjee and Catravas, 2008; Li et al., 2002b). En effet, les facteurs de risque associés aux maladies cardiovasculaires (comme l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le diabète de type II ou le tabagisme) stimulent la production de molécules oxydantes au sein de la paroi vasculaire. La NADPH oxydase représente une source majeure de ces molécules oxydantes. Il a été observé, dans des modèles animaux d'hypertension, de diabète et de sédentarité ainsi que chez des patients exposés aux facteurs de risque cardiovasculaires, qu'elle est surexprimée ainsi qu'activée.(Napoli et al., 2006). On pense donc que la dysfonction endothéliale est un facteur important dans le développement de l'athérosclérose et autres pathologies associées (hypertension et insuffisance cardiaque). La sténose valvulaire aortique y est également associée.(Poggianti et al., 2003)

D. VIEILLISSEMENT ET PATHOLOGIE CARDIOVASCULAIRE

D.1. Réparation cellulaire et fibrose

Chez les adultes, la réparation cellulaire initiée par une lésion mène à un tissu fibrotique non-fonctionnel appelé cicatrice, un amas de fibroblastes et de matrice extracellulaire désorganisée. Lors de lésions, plusieurs voies intracellulaires et intercellulaires sont activées pour restaurer l'homéostasie et l'intégrité du tissu atteint. Plusieurs types cellulaires sont donc recrutés au site de la lésion, comme les cellules de l'inflammation (neutrophiles, monocytes, lymphocytes et cellules dendritiques), les cellules endothéliales, les fibroblastes et autres types cellulaires dépendamment du tissu. La réparation cellulaire s'exécute en trois étapes qui se superposent, soit l'inflammation, la formation du nouveau tissu et le remodelage (Gurtner et al., 2008).

L'inflammation prévient la perte de sang et de fluide, élimine les cellules mortes dues à la lésion et prévient l'infection en formant une matrice de fibrine. Vient

ensuite la formation du nouveau tissu, étape caractérisée par la migration et la prolifération de plusieurs types cellulaires. Ceci inclut l'angiogénèse et le remplacement de la matrice de fibrine par le tissu de granulation accompli par les macrophages et les fibroblastes. Également, à cette étape, certains fibroblastes se différencient en myofibroblastes qui permettent de rapprocher les extrémités de la lésion pour favoriser la réparation du tissu en plus de produire, avec les fibroblastes, de la matrice extracellulaire constituée principalement de collagène. Finalement, la plupart des cellules endothéliales, des macrophages et des myofibroblastes sorte du site de réparation ou deviennent apoptotiques, alors que les cellules mésenchymales et épithéliales continuent leurs interactions pour réguler l'intégrité et l'homéostasie du tissu en réparation lors du remodelage. À cette étape, la matrice extracellulaire est remodelée et le collagène de type III est remplacé par le collagène de type I via les MMPs sécrétées par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les macrophages (Gurtner et al., 2008).

Cependant, un dérèglement de la réparation tissulaire causé par des dommages chroniques entraîne un dépôt massif de matrice extracellulaire, et mène donc à la fibrose. Les lésions faites à la barrière endothéliale, la libération de cytokines fibrogéniques TGF- β 1, le recrutement de cellules inflammatoires, l'activation des cellules productrices de collagène et autres facteurs sont des événements responsables de la fibrogénèse (Kisseleva and Brenner, 2008). Au niveau du système vasculaire, la fibrose engendre un épaissement et une rigidité des vaisseaux, ainsi que de la valve aortique, entraînant des anomalies hémodynamiques perceptibles ou non. Dans le cas de la SVA initiée par une lésion endothéliale, la fibrose est causée par l'accumulation de lipoprotéines, l'infiltration de cellules circulantes et la formation de matrice. Ceci mène à un épaissement progressif de la valve et entraînant la calcification du tissu, réduisant la mobilité des feuillets (Freeman and Otto, 2005). Ce dérèglement de la réparation tissulaire est de plus en plus présent avec l'âge, principalement causé par les lésions répétitives au même endroit et/ou par la sénescence des cellules souches responsables de la régénération des tissus.

D.2. Syndrome de Werner

Nous savons que le vieillissement est un facteur de risque important des maladies cardiovasculaires. En effet, il a été démontré que les gens souffrant de syndrome de vieillissement accéléré, comme la progérie et le Syndrome de Werner (WS), développent prématurément des maladies cardiovasculaires et risquent, dès l'âge de 13 ans, de succomber à des infarctus du myocarde ou à des accidents vasculaires cérébraux. Également, calcification et fibrose ont été observée au niveau des feuillets de la valve aortique chez des patients souffrant de progérie (Capell et al., 2007). Il a été remarqué que, chez les patients souffrant du WS, l'athérosclérose s'étend jusque dans les artérioles, alors qu'elle se limite aux artères de gros calibre chez les patients normaux (Chen and Oshima, 2002).

Le WS est une maladie autosomale récessive qui, au niveau cellulaire, se caractérise par une instabilité génomique et une hypersensibilité aux agents génotoxiques (Li et al., 2008). Ceci entraîne un vieillissement accéléré, c'est-à-dire un déclin dans la fonction physiologique de plusieurs organes, notamment ceux qui se renouvellent plus fréquemment comme la peau. Cette maladie est causée par la perte de fonction mutationnelle de la protéine Werner (WRNp) (Chen et al., 2003). La WRNp est une hélicase de la famille des RecQ ayant une activité hélicase et exonucléase. Elle joue aussi un rôle dans la réparation de l'ADN endommagée, la réplication, la recombinaison et la maintenance des télomères (Chen et al., 2003; Chen and Oshima, 2002; Li et al., 2008); ces derniers étant considérés comme l'horloge biologique d'un organisme. En effet, le télomère est une région d'ADN non-codante situé aux extrémités des chromosomes et servant de structure de protection à ceux-ci. La longueur du télomère exprime la longévité d'une cellule. La perturbation de cette structure, comme le stress oxydant (Jones, 2008), entraîne une réponse menant à l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la sénescence (Karlseder et al., 2002). Aussi, il a été démontré que la WRNp se situait au niveau des télomères et pouvait avoir un rôle dans la résolution de la structure télomérique ainsi que dans la progression de la fourche de réplication aux extrémités du chromosome, prévenant le

dysfonctionnement du télomère (Crabbe et al., 2004; Opresko et al., 2004). En somme, une altération de l'activité de WRNp affecte la viabilité des cellules et leur fonction. En effet, il a été démontré que les cellules humaines provenant de patients ayant le syndrome de Werner étaient beaucoup plus sensibles aux agents qui endommagent l'ADN à la fourche de réplication, comme l'inhibiteur de la topoisomérase (Pichierri et al., 2000). Aussi, les fibroblastes, autant que les MSCs, provenant de patients ayant le syndrome de Werner, démontrent une prolifération défectueuse et bon nombre d'aberrations chromosomiques (Baird et al., 2004; Dhillon et al., 2007).

D.3. Sénescence et cellules souches

Les cellules progénitrices mésenchymales ou MSCs sont responsables de la maintenance comme de la réparation tissulaire et se retrouvent dans tous les tissus du mésoderme embryonnaire (fœtal et adulte) mais surtout dans la moelle osseuse. Elles sont capables d'auto-renouvellement et de se différencier en plusieurs types cellulaires comme en fibroblastes, ostéocytes, chondrocytes et adipocytes, ainsi que d'acquérir un phénotype caractéristique des cellules neurales, endothéliales et musculaires (Fehrer and Lepperdinger, 2005; Pittenger and Martin, 2004). À l'âge adulte, les MSCs sont normalement dans un état de quiescence jusqu'à ce qu'elles soient sollicitées et sont donc moins actives métaboliquement que les cellules effectrices (Sharpless and DePinho, 2007).

Cependant, avec l'âge, les MSCs semblent moins efficaces et sont associées au vieillissement ainsi qu'à l'épuisement des organes. Les accumulations de dommages oxydatifs, de défauts de réplication et de réparation qui engendrent des mutations, ainsi que l'érosion des télomères entraînent un effet épigénétique sur la réparation de l'ADN et autres programmes de maintenance du génome, ce qui affecte nécessairement la fonction des cellules (Burhans and Weinberger, 2007; Sharpless and DePinho, 2007). Alors les cellules entrent dans un état sénescence, irréversible, caractérisé par une diminution des capacités de prolifération et de différenciation

(perte de la multipotentialité pour les MSCs) ainsi que par des changements phénotypiques (production de β -galactosidase et changements morphologiques entre autres) et un arrêt du cycle cellulaire (Fehrer and Lepperdinger, 2005; Minamino and Komuro, 2007; Sethe et al., 2006). Tout ceci entraîne une altération des capacités fonctionnelles des organes puisque les cellules dysfonctionnelles et les tissus lésés ne sont plus remplacés aussi efficacement. Dans le cas de la SVA, les MSCs sénescents pourraient être en cause dans la calcification des tissus, optant pour un phénotype ostéoblastique plutôt que fibroblastique lors de la différenciation.

E. LIPIDES ET PATHOLOGIE CARDIOVASCULAIRE

E.1. Gestion des lipides circulants

Physiologiquement, la gestion des lipides commence par l'absorption des acides gras (principalement sous forme de triglycérides) au niveau de l'épithélium intestinal. Par la suite, leur incorporation dans des chylomicrons les mènent dans la circulation lymphatique (Marieb, 1999). Ces derniers seront hydrolysés par la lipase lipoprotéique, au niveau systémique, pour distribuer les triglycérides (source énergétique) et le cholestérol aux cellules, puis par la lipase hépatique pour les besoins métaboliques du foie. Les chylomicrons et les lipoprotéines à très basse densité (VLDL) ont cette même fonction de distribuer les triglycérides et le cholestérol aux cellules, sauf que les chylomicrons proviennent des intestins (voie exogène) alors que les VLDLs proviennent du foie (voie endogène) et deviennent des LDLs lorsqu'elles ont distribué une bonne partie de leurs triglycérides (Gotto, 2004). Les LDLs et les VLDLs qui retournent au foie se déchargent de leur cholestérol par l'intermédiaire des récepteurs LDL (LDLR) hépatiques qui sera catabolisé (Kapur et al., 2008; Krimbou et al., 2006; Marcil et al., 2004; Movva and Rader, 2008).

Les lipoprotéines de haute densité (HDLs) font parties d'un processus appelé le transport à rebours du cholestérol (RCT) qui permet au cholestérol et aux

phospholipides en excès des cellules périphériques de retourner au foie, soit pour être réutilisé, soit pour être excrété dans la bile ou les fèces. Les particules de HDLs naissent d'une protéine pauvre en lipide synthétisée chez l'humain par le foie et les intestins, l'apoprotéine A-I (ApoA-I). Elle acquiert sur place et en périphérie des phospholipides et du cholestérol par l'intermédiaire de l'ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1), une protéine ubiquitaire associée aux membranes des cellules périphériques qui contrôle l'efflux actif du cholestérol cellulaire. Les HDLs naissantes en circulation acquièrent davantage de phospholipides et de cholestérol libre. Une enzyme associée aux HDLs, la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT), estérifie au fur et à mesure le cholestérol libre et génère donc un HDLs mature. Les molécules de cholestérol libre et estérifié sont ensuite retournées au foie, soit directement via le récepteur scavenger BI (SR-BI) des cellules hépatiques, soit indirectement via la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP). Cette dernière est responsable de l'échange du cholestérol estérifié des HDLs contre les triglycérides provenant de lipoprotéines riches en triglycérides (Kapur et al., 2008; Krimbou et al., 2006; Marcil et al., 2004; Movva and Rader, 2008).

E.2. Influence sur la progression des pathologies cardiovasculaires

Les LDLs, si elles restent en trop grand nombre dans la circulation sanguine, peuvent s'infiltrer sous la barrière endothéliale des vaisseaux et initier l'athérosclérose (Zannis et al., 2004). Par contre, les HDLs, responsables de l'extraction, du transport et de la redistribution des lipides dans l'organisme, agissent comme facteur de protection contre le développement de l'athérosclérose. En effet, un niveau plasmatique de HDL-cholestérol élevé, inversement proportionnel à l'incidence des maladies cardiovasculaires (Kapur et al., 2008), active le RCT du cholestérol via le phénomène de l'efflux du cholestérol (Movva and Rader, 2008). En plus de leur rôle dans le RCT, d'empêcher l'accumulation du cholestérol cellulaire et de maintenir une homéostasie normale des lipides dans les macrophages, les HDLs agissent comme antioxydant, possèdent des propriétés anti-inflammatoires, inhibent l'agrégation plaquettaire et modulent la fonction immunologique (Krimbou et al.,

2006). De plus, elles ont des effets anti-apoptotiques et favorisent la fonction endothéliale (Movva and Rader, 2008). Il semble donc que les HDLs ont des propriétés anti-athérogéniques globales, agissant sur la plupart des facteurs de risque de l'athérosclérose, et ayant même un effet positif sur le vieillissement (Zuliani et al., 2007).

E.3. Traitement

En plus de faire des modifications sur la diète et sur le style de vie pour augmenter le niveau de HDL-cholestérol sérique, on utilise le moyen de la thérapie pharmacologique standard qui comprend les niacines, les fibrates et les statines (Kapur et al., 2008; Marcil et al., 2004). Les Niacines agissent en réduisant le catabolisme de l'ApoA-I, mais on ne connaît pas très bien leur mécanisme d'action (Jin et al., 1997). Les fibrates activent le facteur de transcription nucléaire « peroxisome proliferating activator receptor » α (PPAR α) qui augmente l'expression des gènes de l'apolipoprotéine A-I hépatique, des lipases lipoprotéiques ainsi que de ABCA1, et donc favorise le RCT (Tilly-Kiesi and Tikkanen, 1992). Les statines inhibent la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA), une enzyme-clé dans la biosynthèse du cholestérol, et augmente la production de LDLR, ce qui a pour effet de diminuer les niveaux de LDLs plasmatiques (Linsel-Nitschke and Tall, 2005). Chacune de ces médications a un effet plus ou moins marqué sur l'augmentation du HDL-C, mais leur combinaison amplifie leur efficacité (Artigou et al., 2007). Également, de nouvelles approches pour faire augmenter le HDL-C sérique sont présentement à l'étude : administration d'ApoA-I exogène et d'un peptide mimétique de l'ApoA-I, inhibiteur de CETP, augmentation de l'activité de ABCA1, inhibition du récepteur de SR-B1, agoniste des PPARs et autres drogues retardant le catabolisme des HDLs (Kapur et al., 2008; Marcil et al., 2004).

F. ÉTUDE SUR LA PROGRESSION DE LA SVA

F.1. Modèle animal

Les souris sont extrêmement résistantes à l'athérosclérose. La seule exception est la souche C57BL/6. Cependant, lorsque nourri avec une diète riche en cholestérol contenant de l'acide colique, les lésions vasculaires des C57BL/6 diffèrent de chez l'humain du point de vue localisation et nature histologique. Toutefois, il y a des avantages à utiliser les souris comme modèles pour l'athérosclérose. Entre autres, leur génome est assez bien connu et nous permet de cibler les gènes reliés à la susceptibilité à l'athérosclérose. Leur petite taille, quoiqu'un problème pour faire des chirurgies ou prendre des mesures échographiques, ainsi que leur faible coût permettent d'avoir une plus grande population expérimentale à des fins statistiques. Aussi, les expériences sollicitant l'administration d'agents pharmaceutiques requièrent une quantité inférieure comparée aux modèles plus gros comme le lapin (Jawień et al., 2004; Whitman, 2004).

F.2. Diète

Lorsque soumis à un régime riche en gras, la souche C57BL/6 expose une diminution marquée des niveaux de cholestérol-HDL et d'ApoA-I, alors que d'autres souches maintiennent des hauts niveaux pour ces deux paramètres (LeBoeuf et al., 1990). En effet, la souche C57Bl/6 possède un gène de susceptibilité à l'athérosclérose, Ath-1, qui détermine le niveau de HDL en réponse à une diète riche en gras (Paigen et al., 1987). Aussi, il a été rapporté pour la première fois dans un modèle murin que la SVA peut être initié par un régime "high-fat/high-carbohydrate" (HF/HC) avec un contenu relativement pauvre en cholestérol. En plus d'induire une dyslipidémie modérée, l'obésité et l'hyperglycémie, ce qui rappelle les facteurs athérogéniques retrouvés en Amérique du Nord, cette diète induit également des anomalies significatives de la valve aortique autant *in vivo* (aire de valve diminuée, vitesse transvalvulaire augmentée) qu'*ex vivo* (épaississement des

feuillet, infiltration de lipides et de macrophages, signes de calcification) (Drolet et al., 2006).

F.3. Effet du vieillissement

Une contribution des cellules de la moelle osseuse a été démontrée concernant la présence de fibroblastes et de cellules musculaire lisses dans les valves cardiaques adulte (Deb et al., 2005; Visconti et al., 2006). De plus, des études ont démontré une perte de prolifération au niveau des cellules progénitrices provenant d'organisme atteint du WS (Lebel and Leder, 1998) ainsi qu'une réduction de l'habilité des cellules souches mésenchymales à maintenir l'homéostasie chez les mammifères âgés : déclin dans le nombre de progéniteurs et perte de leur fonctionnalité causé par l'accumulation de dommages oxydatifs au niveau de l'ADN (Stolzing and Scutt, 2006).

Plusieurs mutants murins du gène Werner ont été créés mais un type de mutation semble donner un phénotype qui se rapproche du syndrome de Werner chez l'humain. Ce modèle consiste en une délétion partielle du domaine hélicase (les motifs III et IV) (Figure 3) qui entraîne une plus grande sensibilité à la camptothécine (inhibiteur de topoisomérase), une augmentation de l'instabilité génomique, une attrition des télomères et une augmentation de l'incidence aux tumeurs (Lebel and Leder, 1998). Par le fait même, ces souris mutantes $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ développent une fibrose cardiaque interstitielle sévère (Massip et al., 2006).

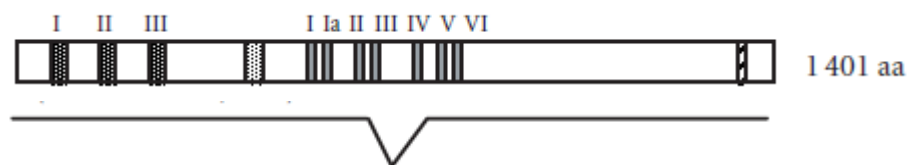


Figure 3. Cadre de délétion du gène WRN chez la souris proposé par Lebel et Leder (1998). Adapté de Chen L et Oshima J (2002) *J Biomed Biotechnol.* 2(2):46-54

G. HYPOTHÈSE ET BUTS

La SVA est la pathologie valvulaire, la plus fréquente dans les pays développés et surtout chez les personnes âgées (Aronow, 2007; Carabello and Paulus, 2009). Comme l'athérosclérose, la SVA est un processus inflammatoire complexe incluant la dysfonction endothéliale, le dépôt de matrice extracellulaire, l'accumulation de lipoprotéines et la calcification des feuillets de la valve aortique contribuant à l'épaississement et au durcissement des feuillets (Guerraty and Mohler Iii, 2007; Helske et al., 2007). Également, le WS est une maladie de vieillissement prématuré causé par le gène WRN (Yu et al., 1996) et qui entraîne l'apparition précoce de la maladie cardiovasculaire comme la sténose valvulaire (Capell et al., 2007; Chen et al., 2003; Chen and Oshima, 2002).

Des modèles murins expérimentaux sur d'hypercholestérolémie ou sur le WS ont déjà fait l'objet d'études et ont démontrés des signes de SVA (Drolet et al., 2006; Massip et al., 2006). Sachant que la SVA est souvent diagnostiquée chez les personnes âgées, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'utiliser un modèle de vieillissement prématuré pour étudier la progression de cette valvulopathie et sa relation avec les cellules souches sénescents. Dans cette expérience, nous supposons qu'un modèle murin de vieillissement $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ combiné à une diète "high-fat/high-carbohydrate" devrait mener à une SVA plus rapidement que chez les souris C57Bl/6 nourries avec la même diète. Nous avons donc mesuré plusieurs paramètres (échocardiographie, analyses sanguines et des cellules de la moelle osseuse, marqueurs d'inflammation et d'oxydation, analyses de la fonction endothéliale de la valve et analyses histologiques) pour comparer les caractéristiques de la SVA entre ces deux modèles.

MÉTHODES DÉTAILLÉES

H. STRATÉGIE DE L'APPROCHE EXPÉRIMENTALE

Dans l'optique de développer un modèle murin qui pourrait permettre d'obtenir une progression de la SVA plus rapidement, nous voulons coupler les facteurs de susceptibilité de cette pathologie : le vieillissement et la dyslipidémie. Un modèle de souris Wrn a été créé par le Dr. Michel Lebel (Centre de Recherche en Cancérologie, Hôpital Hôtel-Dieu de Québec, CHUQ) et récemment, son équipe et celle du Dr. Éric Thorin ont observé des signes évidents de SVA chez des souris Wrn Wrn^{Δhel/Δhel} dans un background génétique de C57Bl/6 et âgées de 12 mois (Massip et al., 2006). Aussi, l'équipe des Drs. Drolet et Couët a démontré que le simple fait de donner une diète riche en lipides et en carbohydrate (High-Fat/High-Carbohydrate ou HF/HC) pendant 4 mois à des souris C57Bl/6 pouvait induire une SVA significative caractérisée par une diminution moyenne de 44,5% de la surface valvulaire aortique indexée au poids des souris, une légère calcification et un épaissement marqué des feuillets valvulaires aortiques (Drolet et al., 2006). Nous avons donc combiné l'effet de vieillissement et la diète HF/CH chez des souris C57Bl/6 (contrôle) et Wrn^{Δhel/Δhel} (WrnΔhel) et comparé ces deux groupes afin de caractériser la SVA.

Les deux différentes lignées de souris, soit contrôle et WrnΔhel, ont été placées sous une diète HF/HC pendant 24 semaines. Nous avons recueilli des données d'échocardiographies des groupes au cours de l'étude pour surveiller la progression de la SVA. Nous avons également effectué une pesée de chaque souris à chaque échocardiographie. Les souris ont été sacrifiées pour effectuer divers prélèvements à des fins d'analyses sériques, histologiques et cellulaires : sang, cœur, aorte, foie, rate, humérus et moelle osseuse.

I. MODÈLE ANIMAUX ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Les soins et les procédures exercés sur les animaux sont conformes avec les directives du concile canadien sur les soins des animaux et ont été approuvés par le comité éthique institutionnel sur les animaux de recherche. Nous avons utilisé des souris C57BL6Crl (contrôle) (Charles River) et des souris $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ ($Wrn\Delta hel$) dans un background génétique de C57Bl/6NHsd (laboratoire Dr. Lebel, CHUQ - Hôtel-Dieu de Québec, Qc) âgées entre 12 et 15 semaines. Nous avons soumis les deux lignées à une diète HF/HC (BioServ F3283) pour obtenir un groupe contrôle (contrôle, n = 11) et un groupe Werner ($Wrn\Delta hel$, n = 9). Le lard est la source de gras de la diète qui contient 385.5 g de lard/Kg de nourriture et contient 95 mg de cholestérol/Kg de lard; aucune autre source de cholestérol n'a été ajoutée et la diète ne contient pas de cholate. Une échocardiographie de base et une pesée ont été effectuées sur les deux groupes à la semaine 0 puis une aux 4 semaines jusqu'à la semaine 20, ainsi qu'aux semaines 21, 22, 23 et 24. Nous avons procédé aux sacrifices 1 ou 2 jours après la dernière échocardiographie en anesthésiant les souris avec une solution de kétamine (Bioniche Animal Health Canada) et de xylazine (Rompun, Bayer HealthCare) à base saline, à 0,1 mg/g et 0,2 mg/g respectivement, pour effectuer une ponction cardiaque. L'aorte, le cœur, le foie, la rate, les humérus, les fémurs et les tibias ont été aussi prélevés pour des analyses subséquentes.

J. ÉCHOCARDIOGRAPHIE

Les échocardiographies transthoraciques ont été effectuées aux 4 semaines à partir de la semaine 0 jusqu'à la semaine 20, puis hebdomadairement de la semaine 20 à la semaine 24. Les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane à 2,5% dans 500ml d'O₂/min pour procéder à l'échocardiographies. Les échocardiographies ont été effectuées à l'aide d'une sonde GE Ultrasound i13L (10 ~ 14 Megahertz) et le système d'échocardiographie Vivid 7 Dimension system (GE Healthcare Ultrasound, Horten, Norway). Les moyennes de mesure sur trois cycles cardiaques consécutifs ont

été utilisées pour chaque mesure échographique. Une attention particulière a été portée pour obtenir des plans d'imagerie similaires sur plusieurs analyses.

J.1. Morphologie de la valve aortique

Nous avons mesuré la dimension de l'ouverture d'écoulement du ventricule gauche (LVOT = left ventricular outflow tract) sur un plan parasternal grand axe et l'aire transversale du LVOT (CSA_{LVOT}) a été calculé. Une vue apical 5 chambres a été utilisé pour obtenir l'intégrale vitesse-temps du flux transversale du LVOT (VTI_{LVOT}) à l'aide d'enregistrement en mode Doppler pulsé près de la valve aortique. Une onde continue Doppler a été utilisée pour obtenir l'intégrale vitesse-temps du flux transversal de la valve aortique (VTI_{AO}). L'aire de la valve aortique (AVA) a été mesurée selon les équations suivante : $CSA_{LVOT} \times (VTI_{LVOT} / VTI_{AO})$.

J.2. Étude d'élasticité de la racine aortique

Pour l'étude des propriétés élastiques de l'aorte, les diamètres aortiques à la systole et à la diastole ont été mesurés en mode-M sur un plan parasternal grand axe au niveau de la valve aortique. La vélocité au niveau de la paroi aortique postérieure (PWV) ainsi que l'index de tension aortique (SI%) ont été calculés : (diamètre aortique systolique – diamètre aortique diastolique / diamètre aortique diastolique) x 100. Le spectre en mode-M du ventricule gauche a été obtenu sur un plan parasternal grand axe pris au niveau des muscles papillaires. Les dimensions du ventricule gauche en fin de diastole (LVDd) et en fin de systole (LVDs) ont été mesurées pour évaluer la fraction de raccourcissement (%FS) : $(LVDd - LVDs) / LVDd \times 100$. Aussi, l'épaississement de la paroi antérieure et postérieure du ventricule gauche (LVAW et LVPW) en fin de diastole a été calculé pour mesurer la masse du ventricule gauche (LVmass) : $((LVDd + LVAW + LVPW)^3 - LVDd^3) \times 1.04 \times 0.8 + 0.14$, corrigé par LVDd, par BW pour chaque semaine et par le poids du cœur (HW) à la semaine 24 au sacrifice

K. ANALYSES SANGUINE

La ponction cardiaque a été effectuée à l'aide d'une aiguille 25 g et d'une seringue 1 ml à laquelle 20 unités internationales d'héparine sodique injectable (compagnie LEO, origine porcine) a été ajoutée. Une partie du sang a été conservée pour le compte cellulaire sanguin et l'autre partie a été centrifugée à 2000 g pendant 10 minutes puis congelée à -80°C pour les autres analyses.

K.1. Compte cellulaire sanguin

Le compte cellulaire sanguin a été effectué à partir de 50 ul de sang issu de la ponction cardiaque. Les analyses ont été effectuées toute de suite après la ponction cardiaque à l'aide du compteur de cellules Advia™ 60 de Bayer inc., Toronto, ON. Les paramètres à l'étude sont : Compte de leucocytes (WBC), compte de lymphocytes (LYM), compte de monocytes (MON), compte de granulocytes (GRA), compte d'érythrocytes (RBC), l'hémoglobine (HGB), l'hématocrite (HCT), compte de plaquette (PLT), le plaquettecrite (PCT).

K.2. Analyse biochimique

L'analyse biochimique (le taux de cholestérol total, de cholestérol-HDL et des triglycérides, ainsi que la concentration sanguine de glucose et de calcium) a été effectuée par photométrie (Dimension RxL Max; Dade Behring, Deerfield, IL, USA) à partir de 100 ul de plasma.

K.3. Marqueurs d'inflammation

Les marqueurs d'inflammation (IL-6 et TNF- α) des plasmas ont été mesurés à l'aide du kit Bio-Plex (Mouse Grp I Cytokine 2-Plex Panel X6000000WW, Reagent Kit 10008294, Mouse Serum Diluent Kit 171-305004) de BioRad en utilisant l'appareil Bio-Plex 200 ainsi que le logiciel Bio-Plex Manager 5.0. Les plasmas ont été traités selon la méthode proposée par le kit.

K.4. Dosage du NO

Le dosage du NO \cdot a été effectué à l'aide du kit de détection Nitrate/nitrite Fluorometric Assay Kit (Cayman chemical 780051). Les échantillons de plasma ont été dégelés rapidement puis filtrés dans un filtre 30 kDa Microcon Ultracel (Millipore 42410), adapté pour les centrifugeuses. La lecture de la plaque s'est fait aux longueurs d'onde 360/430 (ex/em) avec l'appareil Varioskan de Thermo Scientific et le programme SkanIt Software 2.4.1. Les plasmas ont été traités selon la méthode proposée par le kit.

L. ANALYSE DE LA MOELLE OSSEUSE

L.1. Isolation de la moelle osseuse

À la suite de la ponction cardiaque lors du sacrifice, les membres inférieurs ont été submergés dans l'alcool 70%, puis la peau a été retirée pour ensuite séparer les pattes au niveau de l'articulation entre le fémur et la hanche. Les muscles ont été retirés puis les fémurs et les tibias ont été conservés dans du PBS froid jusqu'à l'isolation de la moelle osseuse. Les os ont été coupés aux extrémités pour ensuite libérer la moelle osseuse à l'aide d'une seringue de 5 ml de milieu d'isolation (α -MEM de Gibco, 10% FBS de Biocell et 1% Pen-Strep de Sigma) par souris et d'une aiguille 22 g. Une fois isolée, la moelle osseuse a été homogénéisée à l'aide de la même seringue en aspirant et expulsant de manière répétitive la suspension cellulaire, puis filtrée à l'aide d'un filtre Filcon de nylon 70 μ m (BD Biosciences). Nous avons effectué ensuite le compte cellulaire à l'aide d'un hémacytomètre et gardé la suspension cellulaire sur glace pour les analyses subséquentes.

L.2. Tests de prolifération des progéniteurs

Pour les tests sur la prolifération des progéniteurs provenant de la moelle osseuse fraîchement isolée, nous avons utilisées la technologie du Methocult pour souris (StemCell Technologies 05511) pour analyser les progéniteurs hématopoïétiques et celle du Mesencult pour souris (StemCell Technologies M3434) pour analyser les progéniteurs fibroblastiques. Le milieu de Methocult a été ensemencé à 2×10^4 cellules/ml et incubé 14 jours à 37°C et à 5% CO₂ dans des pétris 35x10 mm contenant 1 ml de suspension cellulaire. Le milieu de Mesencult a été ensemencé à 10^6 et 5×10^5 cellules/puits puis incubé également 14 jours à 37° et à 5% CO₂ dans des puits d'une plaque de 6. Le décompte de colonies a été effectué au jour 14 (colonies BFU-E, CFU-G, CFU-M, CFU-GM et CFU-GEMM pour le Methocult et CFU-F pour le Mesencult)

L.3. Caractérisation des cellules de la moelle osseuse

Pour réaliser la caractérisation des cellules de la moelle osseuse par cytométrie en flux, nous avons effectué un test d'apoptose et des marquages pour identifier les populations c-Kit⁺Sca1⁺Lin⁻ ainsi que ALDH⁺/SSEA4⁺ et ALDH⁺/Lin⁻. Une quantité spécifique aux marquages a été prélevée de la suspension cellulaire de moelle osseuse et centrifugée à 500 g pendant 5 minutes, soit 4×10^6 ϕ pour le test d'apoptose, $1,5 \times 10^7$ ϕ pour les tests ALDH et 10^7 ϕ pour le test KSL. La lecture en cytométrie en flux a été effectuée en utilisant l'appareil EPIC[®] XL de Beckman Coulter, dans lequel nous avons recueilli 20 000 événements, ainsi que le logiciel System II[™].

L.3.1. Apoptose

Le test d'apoptose a été réalisé en priorité à la suite de l'isolation des cellules de la moelle osseuse. Pour ce faire, les cellules ont été resuspendues dans de l'annexine V Binding Buffer (BD Pharmingen 51-66121E(556454)) à une

concentration de 10^7 ϕ /ml et ont été marquées, pour 100 μ l de suspension cellulaire, avec 1,25 μ l d'annexine V FITC (BD Pharmingen 51-65874X(556420)) et 2,5 μ l de PI staining solution (BD Pharmingen 5166211E(556463)). La lecture au cytomètre a été effectuée immédiatement après la fin de l'incubation des réactifs (15 minutes à l'abri de la lumière).

L.3.2. Test ALDH

Le test ALDH⁺/SSEA4⁺ et ALDH⁺/Lin⁻ a été réalisé en utilisant la technologie ADLEFLUOR (StemCell Technologies 01700). Les cellules de la moelle osseuse ont été resuspendues à une concentration de 2×10^6 ϕ /ml et traitées selon la méthode proposée par le kit ALDEFLUOR. Ensuite, ces cellules ont été marquées avec 10 μ l d'anti-h/mSSEA4 PE (R&D systems FAB1435P), 10 μ l de mouse hematopoietic lineage Flow Panel biotin (eBioscience 88-7774-75) et 10 μ l de 7-AAD (Beckman Coulter IM3630c). De la streptavidine-PE (BD Biosciences 349023) a été ajoutée aux cellules marquées au mouse hematopoietic lineage Flow Panel biotin après l'incubation des anticorps primaires. Les échantillons ont été gardés sur glace jusqu'à la lecture.

L.3.3. Test KSL

Le test KSL a été réalisé en resuspendant les cellules de la moelle osseuse dans du PBS à une concentration de 10^7 ϕ /ml. Puis pour 100 μ l par tube, les marquages ont été effectués avec 1 μ l d'anti-mouse c-Kit PE (BD Pharmingen 553869), 0,25 μ l d'anti-mouse Sca-1 PE/Cy5 (Biolegend 108110) et 2,5 μ l de mouse lineage mixture 488 (Caltag MLM20). Les échantillons ont été gardés sur glace jusqu'à la lecture.

M. HISTOLOGIE

L'aorte a été ouverte longitudinalement, du cœur au diaphragme. Afin d'obtenir une préparation plane, des incisions suivant le côté ventrale de l'aorte et la courbe intérieure ainsi qu'extérieure de l'arc aortique ont été pratiquées. Les ramifications de l'aorte ont été enlevées et l'aorte a été maintenue sur une surface de cire noire à l'aide d'épingles en acier inoxydable de 0,2 mm de diamètre (Fine Science Tools, Foster City, CA) pour être ensuite fixée 24 heures dans de la formaline à 10% (Chaptec, FGY6010). La surface intimale aortique a été analysée *en face* à l'aide du marquage à l'Oil Red O (0,7% dans du propylène glycol, Sigma O9755) et du contre-colorant Fast Green (0,5% in nano-pure water, Sigma F7258).

N. HISTOCHIMIE

Au sacrifice, les cœurs ont été congelés dans du milieu pour coupe congelée Neg50 (Richard-Allan Scientific, 6502) et entreposés -80°C. Ensuite, les tissus congelés ont été coupés de manière transversale pour permettre la visualisation des trois commissures et des trois feuillets de la valve aortique. Les coupes pour l'analyse des commissures ont été faites près de la jonction sinotubulaire alors que les coupes pour l'analyse des feuillets ont été faites à la mi-sigmoïde. Les coupes de 7 µm d'épaisseur ont été effectuées à -20°C à l'aide d'un cryostat CM1850 UV de Leica. Trois coupes ont été déposées par lame.

N.1. Colorations courantes

Des coupes ont été fixées dans de la formaline à 10% et colorées avec de l'Oil Red O à 60°C pendant 8 min pour observer l'infiltration des lipides dans la valve aortique. Aussi, des coupes congelées ont été utilisées pour effectuer la coloration *Sirius red* (détection du collagène), la coloration *Alizarin red* (détection de foyers de calcification) et la coloration Verhoeff élastine (détection de l'élastine).

N.2. Immunohistochimie

Les anticorps contre F4/80 (macrophages) (BioLegend) (1:250), MMP-9 (R&D MAB9091) (1/100) et combinés à un anticorps secondaire chèvre anti-rat (Sigma B7139) à une dilution de 1:200 ont été utilisés pour l'étude sur les caractéristiques liées à l'athérosclérose. L'anticorps contre SOD2 (Santa Cruz sc-18503) à une dilution de 1:100 combinés à un anticorps secondaire cheval anti-chèvre (Vector BA-9500) à une dilution 1:400, ainsi que les anticorps contre CD31 (abcam ab28364), eNOS (BD 610298) à une dilution 1:50 combinés à un anticorps secondaire chèvre anti-lapin (Vector laboratories BA-1000) à une dilution 1:100 ont été utilisés. Les anticorps primaires ont été incubés 16 heures à 4°C alors que les anticorps secondaires ont été incubés 1 heure à température pièce. La révélation du marquage a été effectuée à l'aide du kit Vectastain ABC (Vector PK6100) pendant 30 minutes ainsi qu'avec le kit peroxydase substrat AEC (Vector SK-4200) pendant 2 min, suivit d'une contre-coloration dans de l'hématoxyline (Sigma MHS32) pendant 1 minute.

N.3. Analyses des colorations et marquages

Pour l'analyses des marquages, les photos des coupes ont été prises au grossissement 20x à l'aide du logiciel Image Pro Plus, version 5.1 et en utilisant un microscope à fond clair (BX41, Olympus, Tokyo, Japon) connecté à une caméra digitale (Q-Color3; Olympus). Une analyse préliminaire sur toute la valve a été effectuée pour le marquage des anticorps contre F4/80 et MMP-9 ainsi que sur les colorations courantes pour déterminer s'il y avait signe d'athérosclérose. Deux commissures par valve pour les marquages SOD2, l'anneau aortique pour les marquages CD31 et eNOS ainsi que les feuillets (côtés fibrosa et ventricularis analysés séparément) pour le marquage CD31 ont été analysés à l'aide du logiciel Image Pro Plus version 6.0. Les paramètres d'analyses étaient l'aire de marquage, le ratio aire de marquage/ aire d'analyse et la densité moyenne de rouge de l'aire de marquage. Pour déterminer les zones marquées, les paramètres de couleur des pixels

(rouge, vert, bleu) ont été ajustés et appliqués indépendamment pour chacun des marquages. Les intervalles de non-marquage ont été rapportés sur la longueur totale des anneaux aortiques et des feuillets pour le marquage CD31. L'épaisseur des feuillets a été calculée à l'aide du logiciel à partir des photos Sirius red.

O. ANALYSES STATISTIQUES

Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart type ou de médiane (25th percentile - 75th percentile) si les variables ne sont pas normalement distribuées. Le modèle d'analyse de covariance des mesures (ANCOVA) a été utilisé pour étudier les paramètres échocardiographiques et les poids de souris entre les groupes Wrn et contrôle durant la période d'étude; les mesures ont été ajustées aux valeurs de base (semaine 0). Pour obtenir un meilleur aperçu de l'évolution au fil du temps, l'ajustement des moyennes à intervalles de confiance de 95% ont été présentés dans les deux groupes à chaque temps d'analyse. Une interaction groupe x temps a été incluse dans le modèle ANCOVA et a été le thème principal de l'analyse testant l'homogénéité de changement de la variable d'intérêt entre le groupe Wrn et contrôle. Dans le cas où une interaction groupe x temps était significative, plusieurs contrastes ont été testés selon un modèle ANCOVA avec des mesures répétées pour expliquer la nature des interactions (test que l'effet temps pour chaque groupe et comparaison entre les groupes pour chaque temps donné). Sinon, des conclusions générales ont été établies, basées sur l'effet principal de groupe ou de temps de ce modèle d'analyse statistique.

Les autres paramètres issus des analyses post-sacrifice (IL-6, TNF α , analyses biochimique des plasmas, compte des progéniteurs, compte cellulaire sanguin, analyse du FACS, poids des organes au sacrifice et mesures (immuno)histologiques) ont été comparés entre les groupes Wrn et contrôles en utilisant l'analyse statistique Student t-test, ou Mann-Whitney test si les hypothèses de distributions ne sont pas remplies. Les corrélations entre les paramètres ont été étudiées dans l'ensemble des

groupes et par groupe en utilisant les coefficients de corrélation de Pearson, ou les coefficients de corrélation de Spearman si les hypothèses de distributions ne sont pas remplies. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du programme SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) et exécutées à un niveau significatif de 0,05.

CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE

L'article qui suit comprend la majeure partie de mes travaux de maîtrise. La très grande majorité des expérimentations, l'optimisation des méthodes et protocoles, la compilation et l'analyse des résultats ainsi que la rédaction de l'article ont été effectuées par le premier auteur de l'article.

Les coauteurs ont principalement contribué au niveau de la conception du projet, des protocoles et des analyses ainsi que par le partage de leurs connaissances. Mélanie Mecteau a initié le projet sur la manipulation des souris et sur les analyses histochimique. Elle a également fait les analyses histologiques de l'aorte et aidée au sacrifice des souris. Francine Poulin a effectué les échocardiographies et le Docteur Yanfen Shi m'a épaulée dans l'analyse et la compréhension de ces données. Geneviève Brand et Anne-Elen Kernaleguen m'ont épaulé pour l'apprentissage de la cytométrie en flux. Dominique Lauzier du laboratoire des Dr Sirois et Dr Tanguay à l'ICM a fait le marquage pour l'élastine. Mariève Cossette a effectué les analyses statistiques. Dr Michel Lebel nous a fourni les souris $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$. Finalement, les Dr Éric Rhéaume et Jean-Claude Tardif ont dirigé et supervisé mes travaux.

L'article sera soumis au journal *Experimental Gerontology* en mai 2010.

**CHARACTERIZATION OF WRN^{ΔHEL/ΔHEL} MICE AS AN AGING MODEL
FOR AORTIC VALVE STENOSIS**

Juliette Trapeaux^a, Yanfen Shi^a, Mélanie Mecteau^a, Francine Poulin^a, Mariève Cossette^b, Geneviève Brand^a, Anne-Elen Kernaleguen^a, Michel Lebel^c, Éric Rhéaume^{a,d}, Jean-Claude Tardif^{a,d}

^a Montreal Heart Institute, Montreal, Québec, Canada

^b Montreal Heart Institute Coordinating Center, Montreal, Québec, Canada

^c Centre de Recherche en Cancérologie de l'Université Laval, Hôpital Hôtel-Dieu de Québec, CHUQ, Québec, Canada

^d Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada

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

Tel.: 514-376-3330 ext. 3612; fax: 514-593-2500.

Running title: Aortic stenosis in an aging mice model

Key words :

Aging, Werner syndrome; Wrn^{Δhel/Δhel} mouse; cardiovascular disease, aortic valve stenosis

P. ABSTRACT

Aortic valve stenosis (AVS) is associated with aging and classical cardiovascular risk factors. Different animal models were recently developed to study AVS and explore new therapies; however, most of these models rely almost exclusively on hypercholesterolemia-related mechanisms for AVS development. Werner syndrome (WS) is a disorder characterized by premature aging. It was recently demonstrated that mutant mice with a deletion of the helicase domain of the Werner gene, the gene responsible for WS, showed hemodynamic profile typical of AVS. We therefore hypothesized that mice with the $Wnr\Delta hel$ deletion could develop AVS earlier than wild-type (WT) mice. We studied the effect of the $Wnr\Delta hel$ mutation by comparing the rate of progression of AVS in homozygous mutant versus WT mice. By twenty-four weeks on a high-fat/high-carbohydrate diet, $Wnr\Delta hel$ mice showed a stronger decrease of the aortic valve area measured by serial echocardiography than WT mice, supported by histological analyses of valve fibrosis but without developing major signs of atherosclerosis such as lipid infiltration or increased inflammation, although some features linked to endothelial dysfunction appeared to be increased in $Wnr\Delta hel$ mice. Other echocardiographic measurements were typical of AVS, such as left ventricle hypertrophy in the $Wnr\Delta hel$ group. We also observed stronger aging properties from $Wnr\Delta hel$ mice bone marrow and blood analyses compared to the WT group. Consequently, this experimental aging model could be used for AVS research without the major confounding atherogenic effects of other experimental models.

Q. INTRODUCTION

Aortic valve stenosis (AVS) is the most frequent cardiac valve disease in developed countries. Considered as an age-related disease, this disorder is becoming more frequent as the mean age of the population increases (Aronow; Carabello and Paulus, 2009). Similarly to atherosclerosis, AVS is a complex inflammatory process involving endothelial dysfunction, extracellular matrix deposition, lipoprotein accumulation and leaflet calcification (Guerraty and Mohler Iii, 2007; Helske et al., 2007). Extracellular matrix remodeling, including collagen synthesis and elastin degradation by matrix metalloproteinases and cathepsins, contributes to leaflet stiffening. Also, severe AVS is associated with the presence of active mediators of calcification and cells with osteoblast-like activity in diseased valves.

Werner syndrome (WS) is a premature aging disease (referred to as “adult progeria”) caused by mutation in the Werner (WRN) gene (Yu et al., 1996). It is characterized clinically by premature graying, loss of hair, increased cancer susceptibility, type 2 diabetes mellitus, ocular cataracts, scleroderma-like skin changes, regional atrophy of subcutaneous fat, osteoporosis, and atherosclerosis beginning in early adulthood (Capell et al., 2007; Chen et al., 2003). As a member of the RecQ helicase family, the WRN protein is involved in DNA repair, replication initiation, replication foci establishment, resolution of stalled replication forks and recombination. It is also implicated in telomere maintenance and repair, as well as in the synthesis of the lagging strand of telomeres. Mutations in WRN lead to limited replicative capacity in addition to increased genome instability and nuclear deformations. Those mutations lead to WS, resulting in cardiovascular events such as valvular disease at an earlier age than commonly seen (Capell et al., 2007; Chen et al., 2003; Chen and Oshima, 2002). Lebel and Leder created a deletion-mutant mouse model in which motifs III and IV of the helicase domain of the *Wrn* gene were removed. The *Wrn* helicase domain was shown to be critical for the maintenance of genome integrity (Lebel and Leder, 1998). Recently, this *Wrn*^{Δhel/Δhel} mouse model

was shown to develop severe cardiac interstitial fibrosis, abnormal increases in visceral fat deposition and in blood triglycerides and cholesterol levels, higher levels of serum and cardiac tissue reactive oxygen species, high blood glucose, and an hemodynamic profile compatible with aortic valve stenosis at 12 months of age under normal diet (Massip et al., 2006).

Experimental models of aortic valve disease were reported in C57BL/6J and LDLR knockout mice after four months under a high-fat/high-carbohydrate diet. Those mice develop resulting in mild dyslipidemia, obesity, hyperglycemia and an early stage of aortic valve disease with significant aortic valve abnormalities both *in vivo* (smaller aortic valve area and higher transvalvular velocities measured by echocardiography) and *ex vivo* (leaflet thickening, lipid and macrophage infiltration, signs of calcification) (Drolet et al., 2006).

In this study, we hypothesized that an aging mouse model based on $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice in combination with the high-fat/high-carbohydrate diet used by the group of Couët and Arsenault (Drolet et al. 2006) would lead to AVS faster than WT mice. We studied multiple AVS and aging characteristics (echocardiographic measurements, blood and bone marrow cell analysis, marker of oxidation, valvular endothelial function integrity, fibrosis, inflammation, and histology) to assess the effects of the $Wrn^{\Delta hel}$ mutation in this experimental model.

R. MATERIALS AND METHODS

R.1. Animals and experimental protocol

Animal care and procedures complied with the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the institutional ethics committee for animal research. $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ (thereafter called $Wrn\Delta hel$) mice on a C57BL/6NHsd background were obtained from Dr Michel Lebel Laboratory (CHUQ - Hôtel-Dieu de Québec, Qc) and C57BL/6Crl mice (Charles River) were used as WT controls. Twenty male mice ($Wrn\Delta hel$ n=9, WT n=11) aged 13-15 weeks were fed with a high-fat/high-carbohydrate diet (Bioserv F3282) for 24 weeks. Echocardiograms were performed at baseline, then every four weeks and every week during the last month. Body weight was obtained at every echocardiogram. Mice were killed one or two days after the last echocardiogram. The heart, the aorta, the femurs and the tibias were removed for further analyses. Blood samples were obtained at sacrifice by cardiac puncture under anesthesia using Ketamine (Bioniche Animal Health Canada)/Xylazine (Rompun, Bayer HealthCare) at 0.1mg/g body weight and 0.2mg/g body weight, respectively, by intraperitoneal injection.

R.2. Echocardiography

Mice were sedated with isoflurane (2.5% in 500 ml of O_2 /min). Studies were carried out with an i13L probe (10-14 Megahertz) and a Vivid 7 Dimension system (GE Healthcare Ultrasound, Horten, Norway). The aortic valve area (AVA) was determined using the continuity equation (Busseuil et al., 2008). To study aorta elastic properties, aortic diameter in both cardiac systole and diastole were measured by M-mode echocardiography in parasternal long axis view at the level of aortic valve. Aortic strain (aS) index was calculated by this formula : (systolic-diastolic aortic diameter)/diastolic aortic diameter X 100. The aortic posterior wall velocity (PWV) was also measured in this view. Left ventricular (LV) M-mode spectrum was

obtained in parasternal short axis view at the level of the papillary muscle. LV dimensions at both end cardiac diastole (LVDD) and systole (LVDS) were measured and LV fractional shortening (FS) was calculated by $(LVDD - LVDS) / LVDD \times 100\%$. The thickness of LV anterior wall (LVAW) and that of LV posterior wall (LVPW) at end cardiac diastole were also measured using this view; LV mass was calculated by $((LVDD + LVAW + LVPW)^3 - LVDD^3) \times 1.04 \times 0.8 + 0.14$. The average of three consecutive cardiac cycles was used for each measurement. Special care was taken to obtain similar imaging planes on serial examinations.

R.3. Blood analysis

Blood cell count was analyzed using the Advia™ 60 automated hematology system (Bayer Inc., Toronto, Canada) with heparinized blood sample obtained by cardiac puncture. Plasma obtained at sacrifice was analyzed. Total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, glucose and calcium levels were measured with an automated filter photometer system (Dimension RxL Max; Dade Behring, Deerfield, IL, USA). IL-6 and TNF- α levels were measured by Bio-Plex technology (Mouse Grp I Cytokine 2-Plex Panel) from BioRad with the Bio-Plex 200 system and the Bio-Plex Manager 5.0 software. NO \cdot level was estimated with a nitrate/nitrite Fluorometric Assay Kit (Cayman chemical). Serum and plasma were filtered with Microcon Ultracel YM-30 devices (Millipore) prior the analysis. Plates were read using a Varioskan (Thermo Scientific) using 360/430 (ex/em) nm wavelengths and data were processed using SkanIt Software 2.4.1.

R.4. Bone marrow cells analysis

Bone marrow cells isolation. Femurs and tibias were dissected away from attached muscle and connective tissue, the ends of the bones were removed and marrow was extruded by inserting a 22-gauge needle into the shaft of the bone and flushing with 5 ml of α -MEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Biocell) containing 1% Pen/Strep (Sigma). The marrow plugs were dispersed by passage through the same needle and the marrow was filtered through a 70 μ m

filter (BD Biosciences). Bone marrow cells were counted with a hemacytometer and the suspension was kept on ice for subsequent analyses.

Characterization of bone marrow progenitors using colony forming units. We used Methocult M3434 (StemCell Technologies) to analyze hematopoietic progenitors and Mesencult Proliferation Kit (mouse) (StemCell Technologies) for mesenchymal precursors. Methocult media was seeded with bone marrow cell suspension at 2×10^4 cells per 35 mm dish and incubated for 14 days at 37°C and at 5% CO₂. Mesencult media was seeded with bone marrow cell suspension at 5×10^5 and 1×10^6 cells/well in a 6-well plate and incubated also for 14 days at 37°C and at 5% CO₂. Colony counting was performed on day 14 (BFU-E, CFU-G, CFU-M, CFU-GM and CFU-GEMM for Methocult and CFU-F for Mesencult).

Apoptosis evaluation and immunophenotyping by flow cytometry analysis. Assessment of apoptosis was achieved quickly following the isolation of bone marrow cells. Cells were resuspended in Annexin V Binding Buffer (BD Pharmingen) at 10^7 cell/ml and 100 µl per tube were stained with Annexin V FITC (BD Pharmingen) and PI staining solution (BD Pharmingen). Flow cytometry was performed immediately after the end of incubation (15 minutes in the dark). Annexin V stained cells were analyzed for apoptosis and Annexin V/PI stained cells for cell death. ALDH/SSEA4/Lin assessment was performed using ADLEFLUOR (StemCell Technologies). The bone marrow cells were resuspended at a concentration of 2×10^6 cell / ml and treated following the manufacturer instructions. Then, these cells were stained with anti-human/mouse SSEA4 PE (R & D systems) or biotinylated mouse hematopoietic lineage Flow Panel (eBioscience) in conjunction to Streptavidin-PE (BD Biosciences) and 7-AAD (Beckman Coulter). For KSL test, bone marrow cells were resuspended in PBS at 10^7 cell/ml and 100 µl per tube were stained with anti-mouse c-Kit PE (BD Pharmingen), anti-mouse Sca-1 PE/Cy5 (Biolegend) and mouse lineage mixture 488 (Caltag). Flow cytometry was performed using a EPICS XL (Beckman Coulter) based on collection of 20 000 events using System II™ software.

R.5. Histology

The aorta was opened longitudinally from the heart to the diaphragm. To obtain a flat preparation, one incision followed the ventral side of the aorta and the inner curvature of the arch and a second incision was made along the outer curvature of the arch. The remaining branches were removed, and the aorta was pinned out on a black wax surface. The aorta was fixed 24 hr in formalin 10% (Chaptec), and was processed for *en face* analysis of the aortic intimal surface using Oil red O staining (0,7% in propylene glycol) and counterstained with Fast Green (0,5% in nano-pure water).

At sacrifice, the hearts were put in Neg-50 frozen section medium (Richard-Allan Scientific) and stored at -80°C. Cross sections of the aortic valves were performed to allow visualization of the three commissures and the three leaflets. Tissue sections for commissures' analyses were performed adjacent to the aortic sinotubular junctions, and at mid-cusp for leaflets.

Tissue staining. Tissue sections were fixed in formalin 10% and stained with Oil Red O at 60°C for 8 minutes to analyze lipid infiltration. Sirius Red, Alizarin red and Verhoeff's elastic stains were also performed on tissue sections.

Immunohistochemistry. Biotin-conjugated F4/80 antibody (macrophages) (BioLegend) (1:250), biotin Ly-6C antibody (monocyte) (BD Pharmingen) (1:100) and MMP-9 antibody (R&D Systems) (1:10) followed by a horse anti-rat secondary antibody (Vector Laboratories) at 1:200 dilution were used for atherosclerosis-related histological study. Also, antibody against SOD2 (Santa Cruz) at 1:100 dilution followed by a horse anti-goat secondary antibody (Vector laboratories) at 1:400 dilution, and antibodies against CD31 (Abcam), eNOS (BD Transduction Laboratories™) at 1:50 dilution followed by a goat anti-rabbit secondary antibody (Vector laboratories) at 1:100 were used for valvular endothelium assessment. Staining was revealed by Vectastain ABC kit (Vector laboratories) and peroxidase

substrate kit AEC (Vector laboratories) and counterstained with hematoxylin (Sigma).

Staining analyses. Pictures of tissue sections were taken at 20x magnification with a computer-based digitizing image system using a light microscope (BX41, Olympus, Tokyo, Japan) connected to a digital video camera (Q-Color3; Olympus) using Image Pro Plus version 5.1 (Mediacybernetics) for picture acquisitions. Commissures, rings and leaflets of the valves were analyzed with Image Pro Plus version 6.0. Area of staining, ratio of staining area /ROI (region of interest which was either the commissures, aortic valve annulus or leaflet) and density in ROI were the parameters for analyses. Density analyses were performed as red mean density for peroxidase, Oil red O and Alizarin red, and mean density for Verhoeff's stain and Sirius Red. Length of CD31 staining was also reported on the total length of the aortic ring and leaflet endothelial wall. Thickness of leaflets was calculated from Sirius red pictures.

R.6. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation for continuous variables, except for those variables that were not normally distributed which are presented as median (25th percentile - 75th percentile). Except where indicated otherwise, the number of animals analyzed per groups were n=11 for WT and n=9 for the Wrn Δ hel group. Repeated measures analysis of covariance (ANCOVA) models were used to study AVA, weight and other echocardiographic parameters across time and between groups (WT vs. Wrn Δ hel), adjusted for the baseline value of the response variable. To get a better insight into the change over time, the adjusted means with 95% confidence intervals were presented in both groups at each time point. The group x time interaction was included in the ANCOVA model and was the main focus of the analysis as it tested the homogeneity of the pattern of change in the response variable between WT and Wrn Δ hel. In case of significant group x time interaction, various contrasts under the repeated ANCOVA model were conducted to explain the nature

of the interaction (test of within-subjects time effect in each group and comparisons between groups at each time point). Otherwise, global conclusions were drawn based on the main time and group effects of the model. Other parameters (IL-6, TNF α , progenitor counts, blood cell counts, flow cytometry data, histology and immunohistochemistry analyses) were compared between WT and Wrn Δ hel groups using Student t-test or Mann-Whitney test when distributional assumptions were not met. The relationships between echocardiographic parameter or HDL-cholesterol and other parameters (Bone marrow cell count, echocardiographic parameters or blood and plasma analyses) were investigated over all groups and within group using Pearson correlation coefficients or Spearman correlation coefficients if distributional assumptions were not met. All analyses were done with SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and conducted at the 0.05 significance level.

S. RESULTS

S.1. Bone marrow and red blood cells analysis

Age is associated with a progressive deterioration of tissues and organs caused mainly by obsolescence of bone marrow-derived regenerative cells. Loss of cells with tissue-repair capacity occurs with aging and lead to age-related diseases such as AVS (Kassem, 2006; Rauscher et al., 2003). Thus, we compared several bone marrow characteristics between C57BL/6 wild-type control (WT) (n=11) and *Wrn* Δ hel (n=5) groups. After bone marrow cell isolation, mononuclear cell (MNC) counts revealed a significant lower cell number in *Wrn* Δ hel mice ($72.9 \pm 8.7 \times 10^6$ cell per mouse in WT vs. $54.2 \pm 7.4 \times 10^6$ cell per mouse in *Wrn* Δ hel; p=0.001). Furthermore, apoptosis assay of bone marrow MNC with Annexin-V and propidium iodide showed a significantly increased of cell death fraction (32.0 ± 3.6 % in WT vs. 39.1 ± 7.3 % in *Wrn* Δ hel; p=0.019) and a trend for a higher apoptosis percentage within the *Wrn* Δ hel group (31.3 ± 3.4 % in WT vs. 39.0 ± 7.3 % in *Wrn* Δ hel; p=0.079). Furthermore, we measured hemoglobin (HGB) and hematocrit (HCT) blood parameters and observed a significant lower level in *Wrn* Δ hel mice (n=5) compared to WT (n=11) (129.9 ± 7.6 g/L in WT vs. 119.9 ± 8.4 g/L in *Wrn* Δ hel; p=0.033, and 0.40 ± 0.03 L/L in WT vs. 0.37 ± 0.03 L/L in *Wrn* Δ hel; p=0.044). However, progenitor assays on bone marrow MNC showed that the macrophage colony forming unit count (CFU-M) and the bone marrow fraction of c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻ (KSL) cells were higher in the *Wrn* Δ hel group. Mesenchymal and total hematopoietic progenitor CFU counts tended to be higher in the *Wrn* Δ hel group (Table 1).

S.2. Weight, lipid profile and glycemia

Metabolic syndrome and hypercholesterolemia are risk factors for the development of AVS, therefore, we looked at body weights and the basic lipid

profiles of WT and *Wrn* Δ hel mice. Overall, mice weight increased significantly with time for both groups ($p < 0.0001$) but no difference was observed between WT and *Wrn* Δ hel mice (Table 2). Also, the total cholesterol, triglycerides and glucose plasma levels were not different between groups. However, HDL-cholesterol level was higher in the *Wrn* Δ hel group ($n=8$) compared to WT group ($n=11$) ($1.60 \text{ mM} \pm 0.17$ in WT vs. $1.86 \pm 0.29 \text{ mM}$ in *Wrn* Δ hel; $p=0.024$) (Table 2).

S.3. The progression of AVS and cardiac remodelling : Echocardiographic measurements

AVS can be noninvasively assessed by serial echocardiography, either for evaluation of aortic valve areas (AVA) or consequences associated with smaller left ventricular opening on cardiac remodelling or function. Therefore, we analyzed AVS-related echocardiographic parameters to compare the AVS severity between WT and *Wrn* Δ hel groups. As presented in Figure 4, from baseline to 24 weeks of HF/HC diet, the pattern of AVA change over time in the two groups was different ($p < 0.0001$ for group x time interaction). Post-hoc test of within-subjects time effect in each group revealed that although AVA remained stable in the WT group ($p=0.557$), AVA decreased significantly in the *Wrn* Δ hel group ($p < 0.0001$). At the end of the experiment (week 24), the AVA had decreased by $19.7 \pm 3.0 \%$ for the *Wrn* Δ hel group whereas the decrease of AVA of the WT group was not significant ($1.3 \pm 2.5 \%$). In fact, AVA from *Wrn* Δ hel mice started to be significantly lower than baseline level at week 16 ($0.729 [0.696-0.763] \text{ mm}^2$ at wk 0 vs. $0.684 [0.650-0.717] \text{ mm}^2$ at week 16; $p=0.006$). Post-hoc test of between-subjects group effect indicates that AVA began to be significantly different between the two groups from week 22 ($0.691 [0.661-0.722] \text{ mm}^2$ in WT vs. $0.630 [0.596-0.663] \text{ mm}^2$ in *Wrn* Δ hel; $p=0.013$). In the same way, a difference in AVA was observed at week 23 ($0.692 [0.661-0.722] \text{ mm}^2$ in WT vs. $0.607 [0.574-0.641] \text{ mm}^2$ in *Wrn* Δ hel; $p=0.0008$) and also at week 24 ($0.574 [0.687 [0.656-0.717] \text{ mm}^2$ in WT vs. $0.540-0.607] \text{ mm}^2$ in *Wrn* Δ hel; $p < 0.0001$).

Table 1. Bone marrow progenitor cell counts of WT and Wrn Δ hel mice after 24 weeks of high-fat/high-carbohydrate diet

	Colony count (CFU)					Cell count (%)
	CFU-F	Hematopoietic progenitors	BFU-E	CFU-G	CFU-M	KSL cells
WT	1.9 \pm 1.7	51.4 \pm 12.3	14.6 \pm 2.9	9.6 \pm 4.9	11.7 (11.7;13.7)	0.11 (0.08;0.14)
Wrn Δ hel	5.5 \pm 3.7	86.7 \pm 36.4	35.5 \pm 19.3	14.9 \pm 6.5	16.0 (12.3; 21.3)	0.17 (0.17;0.19)
p	0.099	0.095	0.072	0.092	0.041	0.028

Hematopoietic progenitor count was established by the summation of BFU-E, CFU-G, CFU-M, CFU-GM and CFU-GEMM. KSL cell counts were obtained by flow cytometry using c-Kit, Sca-1 and mouse lineage mixture antibodies (n=11 for WT and n=8 for Wrn Δ hel). The data are expressed as the mean \pm SD for the first 4 parameters (Student's t test) and as the median (lower quartile; upper quartile) for CFU-M and KSL cells (Mann-Whitney-Wilcoxon test).

Table 2. Weight, plasma lipid profile and glycemia from WT and Wrn Δ hel mice

	Weight (g)		Plasma level			
	week 0	week 24	Total Cholesterol (mM)	HDL-cholesterol (mM)	Triglycerides (mM)	Glucose (mM)
WT	25.2 [22.6-27.7]	48.9 [46.4-51.4]	4.65 \pm 0.77	1.60 \pm 0.17	0.53 \pm 0.15	15.1 \pm 2.0
Wrn Δ hel	25.0 [22.2-27.8]	49.9 [47.1-52.7]	4.75 \pm 0.63	1.86 \pm 0.29	0.56 \pm 0.37	13.9 \pm 5.0
p	0.927	0.601	0.774	0.024	0.784	0.566

Plasma samples at sacrifice (after 24 weeks of HF/HC diet); n=11 for WT and n=8 for Wrn Δ hel. Statistical analyses were done using repeated measures ANCOVA for weight data and Student t-test for plasma level parameters. The data are expressed as the adjusted mean [confidence interval] for weight data and as the mean \pm SD for plasma level parameters.

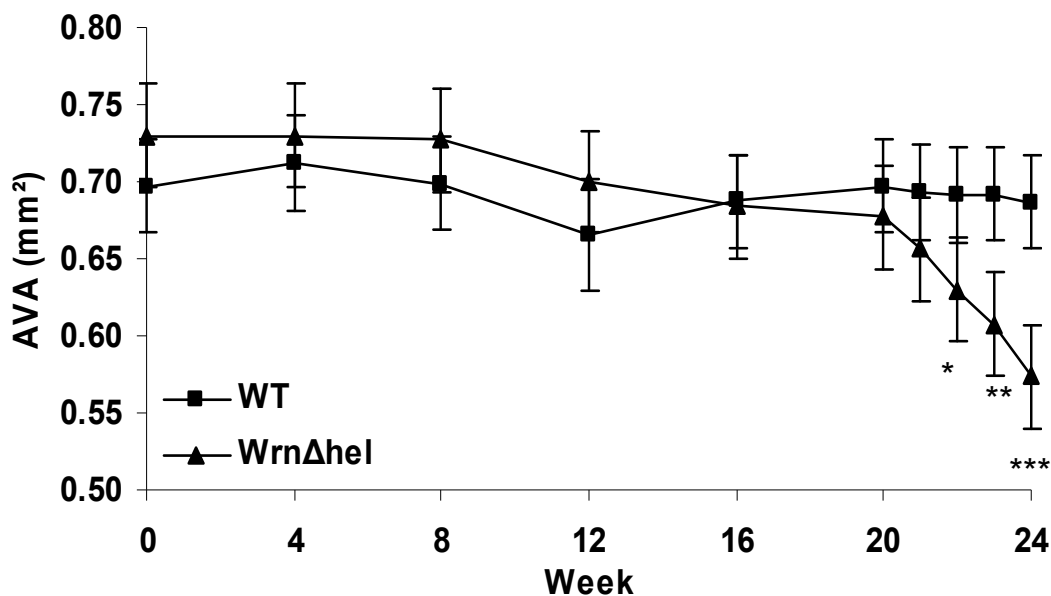


Figure 4. Aortic valve area (AVA) values obtained by echocardiography during the high-fat/high carbohydrate diet period. Comparison between WT group and WrnΔhel group at each time point: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

We also measured during the study course a thicker left ventricular anterior wall (LVAW) ($p = 0.003$) and bigger left ventricle mass (LVmass) ($p = 0.038$) in WrnΔhel mice compared to WT mice (Figure 5a and 5b). Though not statistically significant, a trend ($p = 0.083$) indicating a bigger average left ventricular end-diastolic dimension (LVDd) during the whole study course was observed in the WrnΔhel group compared to the WT group (Figure 5c). These three parameters increased independently with time ($p < 0.0001$). Also, left ventricle fractional shortening (LVFS) decreased with time in both groups: 34.2 [31.4-37.1] % at week 0 vs. 26.5 [23.7-29.3] % at week 24 for the WT group ($p = 0.0003$) and 34.4 [31.2-37.5] % at week 0 vs. 25.4 [22.3-28.6] % at week 24 for the WrnΔhel group ($p = 0.0002$). However, a significant correlation between the decrease in time of AVA and of LVFS could only be found in WrnΔhel mice ($r = 0.70$, $p = 0.036$) (Figure 6).

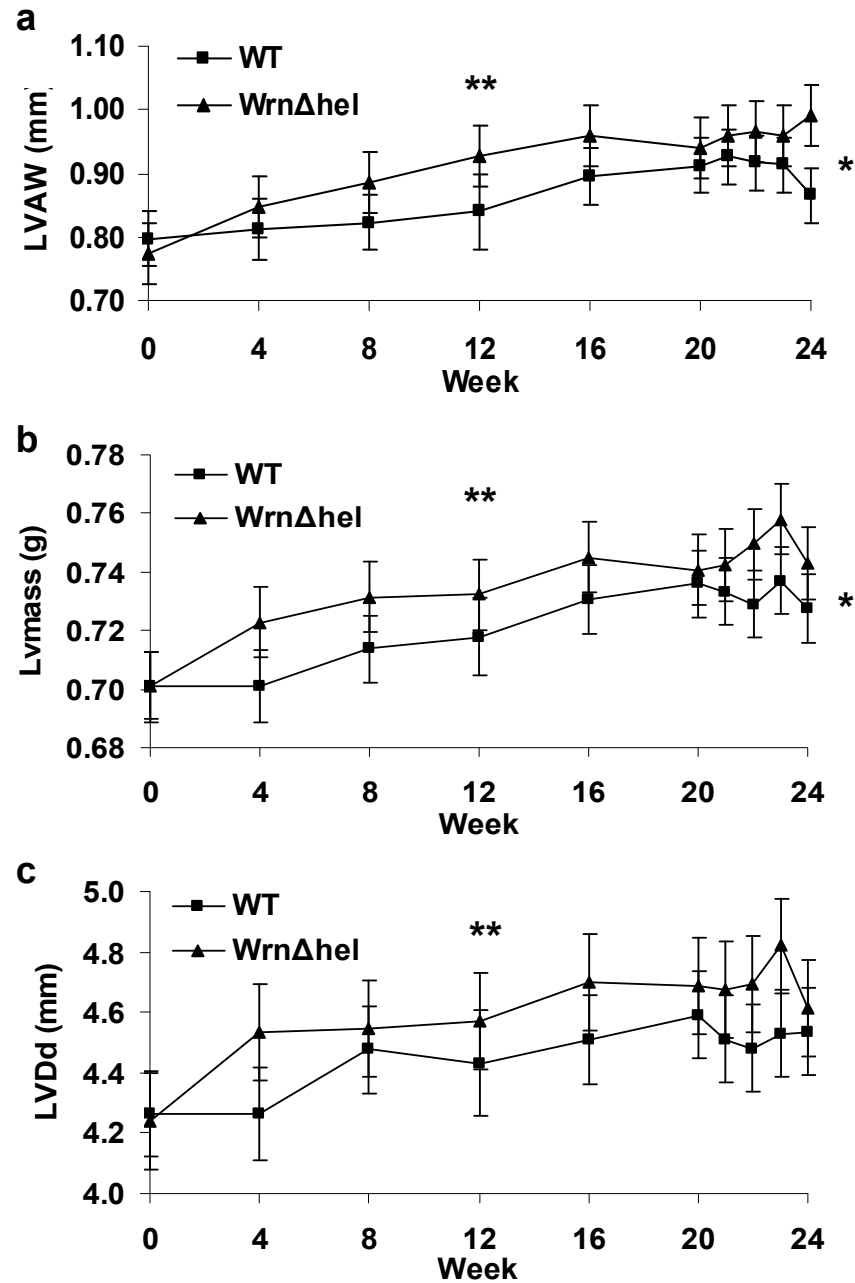


Figure 5. Echocardiographic measurements for cardiac remodeling obtained during the experiment for the WT and WrnΔhel groups. Week 0 corresponds to the start of the high-fat/high-carbohydrate diet and week 24 to the sacrifice. a) left ventricle anterior wall (LVAW), b) left ventricle mass (LVmass) values and left ventricle diameter in diastolic (LVDd). Overall difference between group, * $p < 0.05$; and overall difference between time points, ** $p < 0.0001$.

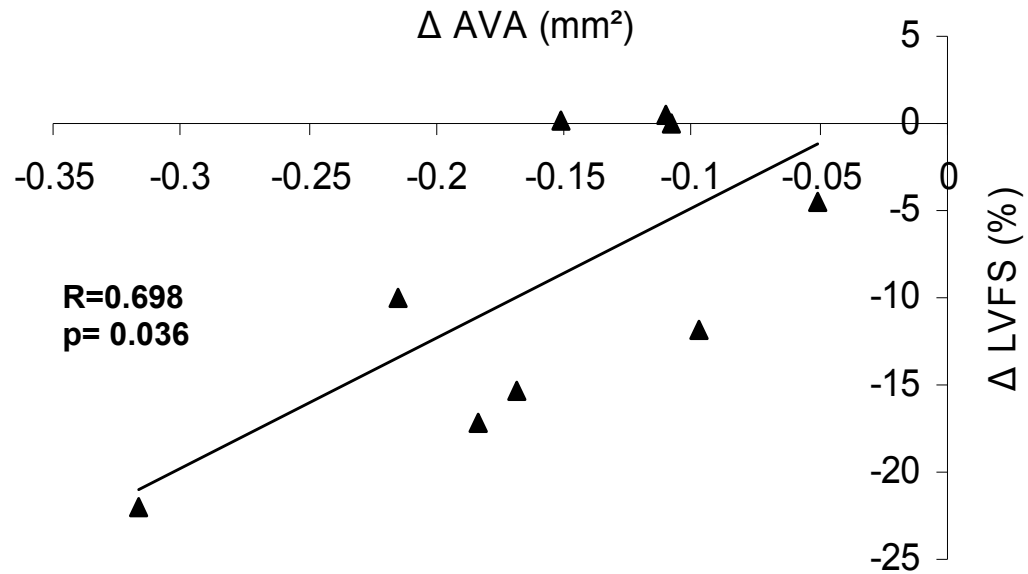


Figure 6. Correlation between the decrease of aortic valve area (AVA) and change of left ventricle fractional shortening (LVFS) from *Wrn* Δ *hel* group (n= 9).

S.4. Study on aortic elasticity: Echocardiographic measurements

Decreased elasticity of the aorta is associated with aging, atherosclerosis risk factors and aortic valve stenosis (Vaturi et al., 2003; Yap et al., 2008). We evaluated aortic elastic properties using M-mode echocardiography at three time points (week 0, 20 and 24) during the study. The aortic strain (aS) index showed a significant group x time interaction ($p=0.038$) that, by post-hoc test of within-subjects time effect, revealed a statistically significant decrease of aS in the *Wrn* Δ *hel* group ($p=0.022$) compared with the WT group ($p=0.596$) which remained stable (Figure 7a). A lower aS has been demonstrated in *Wrn* Δ *hel* compared to WT mice at week 24 (31.6 [26.1-37.2] % for WT vs. 19.6 [13.5-25.8] % for *Wrn* Δ *hel*; $p=0.006$). Also, posterior wall velocity (PWV), which depends on the aortic size and the elastic properties of the aortic wall, showed independently a group effect ($p=0.0013$) and a time effect ($p<0.0001$) (Figure 7b). Nevertheless, a slight tendency was observed for the group x time interaction term ($p=0.0741$) and the contrasts under the repeated ANCOVA model revealed that PWV decreased more in the *Wrn* Δ *hel* group and that

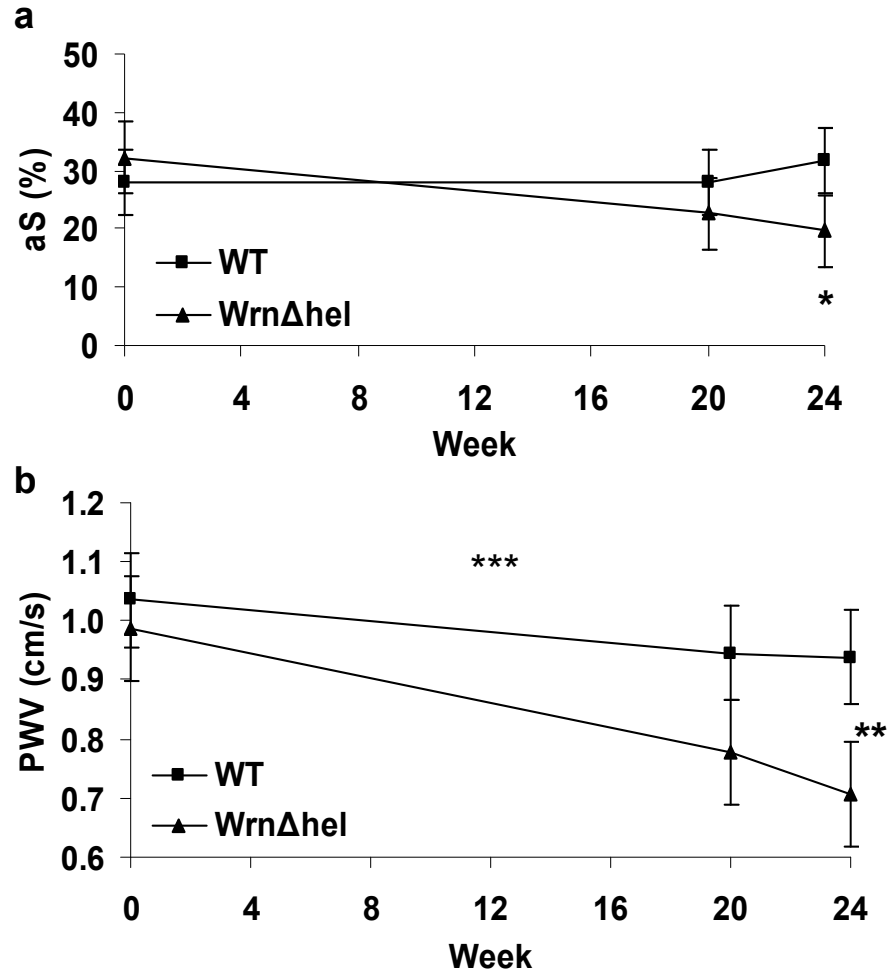


Figure 7. Echocardiographic measurements of aortic root elasticity obtained at baseline and after 20 and 24 weeks of high-fat/high-carbohydrate diet. Comparison between WT group and WrnΔhel group for a) aortic strain (aS) index at week 24, * $p < 0.01$. b) Posterior wall velocity (PWV) overall difference between the two groups, ** $p = 0.001$; and overall difference between time points, *** $p < 0.0001$.

PWV appeared lower in the *Wrn* Δ hel group than the WT group, especially at week 24 (0.9389 [0.8585-1.0192] cm/s in WT vs. 0.7069 [0.6179-0.7960] cm/s in *Wrn* Δ hel).

S.5. Assessment of atherosclerosis and fibrosis in the aortas and aortic valves

Since AVS and atherosclerosis share similar risk factors, such as lipid infiltration, inflammation and extracellular matrix deposition, we looked at usual characteristics of atherosclerosis and fibrosis within the aortas and the aortic valves from our mice. No animal showed significant signs of lipids infiltration using *en face* Oil red O (ORO) analysis of the aortas as no staining could be observed on the intimal surface. Also, macrophages, as detected by immunohistochemistry (F4/80 antibody), and calcification (Alizarin red staining) were absent on aortic valve frozen sections, except for two mice in the WT group and one mouse in the *Wrn* Δ hel group that showed only minimal Alizarin red staining. Plasma calcium remained identical within the two groups. Histological lipid infiltration (ORO), activated monocytes detection (Ly-6C) and valve ring elastin composition by Verhoeff's elastic stain showed no difference for aortic valves between WT and *Wrn* Δ hel groups. For example, the ratio of ORO staining area reported on the area of the commissures was 0.023 ± 0.029 in WT (n=9) vs. 0.030 ± 0.016 in *Wrn* Δ hel (n=6), p=0.63; and the ratio of Ly-6C staining area reported on the area of the valve was $0.0129 [0.0075-0.0291]$ in WT (n=11) vs. $0.0062 [0.0048-0.0099]$ in *Wrn* Δ hel (n=9), p=0.14. In contrast, analysis of aortic valve collagen patterns using Sirius Red staining revealed some differences between the two groups. Although type I collagen content was similar in both groups, detection of type III collagen as thin, weakly birefringent, greenish fibers, showed a difference between groups for aortic valve leaflets (p=0.05). This difference was more pronounced when using a ROI defined as the leaflets' central third (Figure 8) where the ratio of area of type III collagen/ROI was significantly higher in *Wrn* Δ hel mice (0.005 ± 0.005 in WT vs. 0.013 ± 0.008 in *Wrn* Δ hel; p=0.031). Furthermore, there were trends for negative correlations

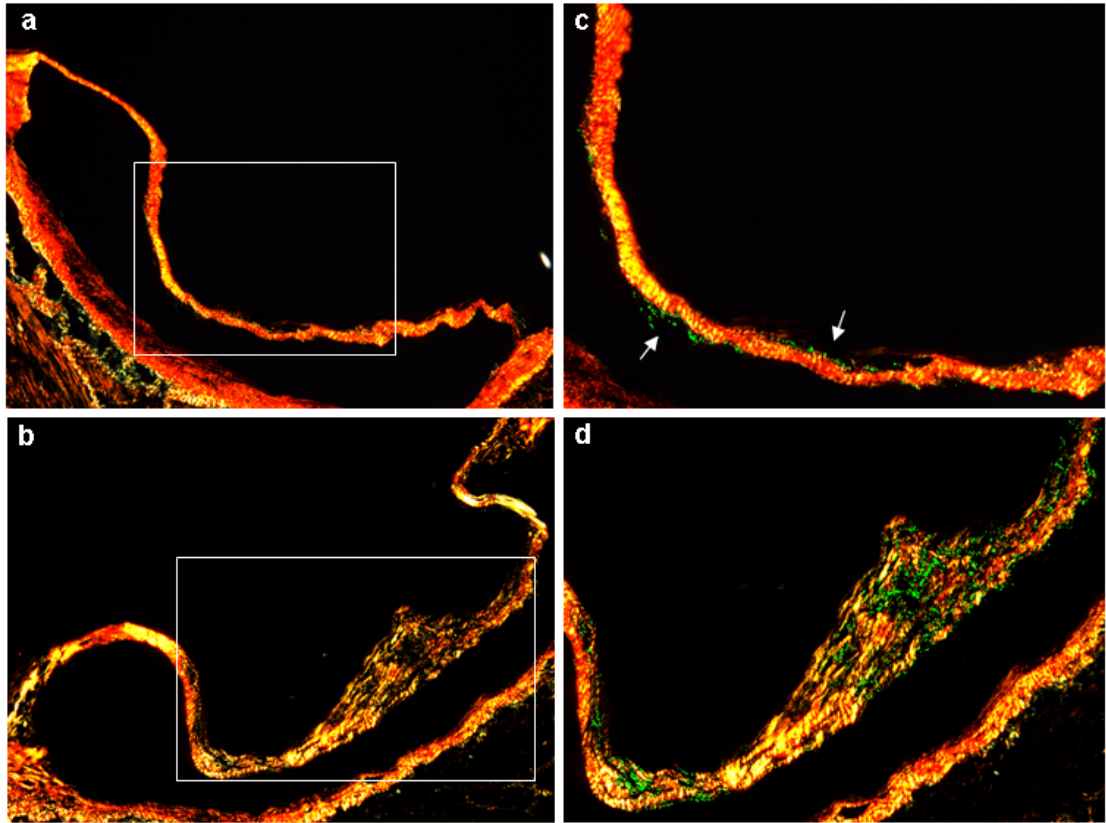


Figure 8. Aortic valve leaflet cross sections for Sirius red staining (20x magnification) of a) WT and b) $Wrn\Delta hel$ mouse. Enlargement of a central third of c) a WT mouse leaflet and d) a $Wrn\Delta hel$ mouse leaflet with Image Pro's green mask on type III collagen staining area to allow a better visualisation of the presence of type III collagen. Collagen detected by Sirius red staining where type I collagen is revealed as yellow-red birefringent fibers and type III collagen is revealed as green birefringent fibers which are more pronounced in $Wrn\Delta hel$ mice than WT.

between the ratio of leaflet central third type III collagen area/ROI and the change over time of AVA ($r=-0.442$, $p=0.067$, $n=18$) or plasma nitrate concentration ($r=-0.482$, $p=0.081$, $n=14$) (data not shown). In addition, we found a significant positive correlation between the same type III collagen parameter and aortic valve leaflet maximal thickness evaluated by histology ($r=0.560$, $p=0.016$, $n=18$) (Figure 9). As fibrosis can be associated with changes in metalloproteinases expression, we also evaluated MMP-9 expression by immunohistochemistry. The MMP-9 staining was lower in valves from the $Wrn\Delta hel$ group, especially in the commissure areas where the median ratio for area of staining/ROI was 0.025 (0.008-0.046) for the WT group vs. 0.004 (0.001-0.007) in $Wrn\Delta hel$ group ($p=0.023$).

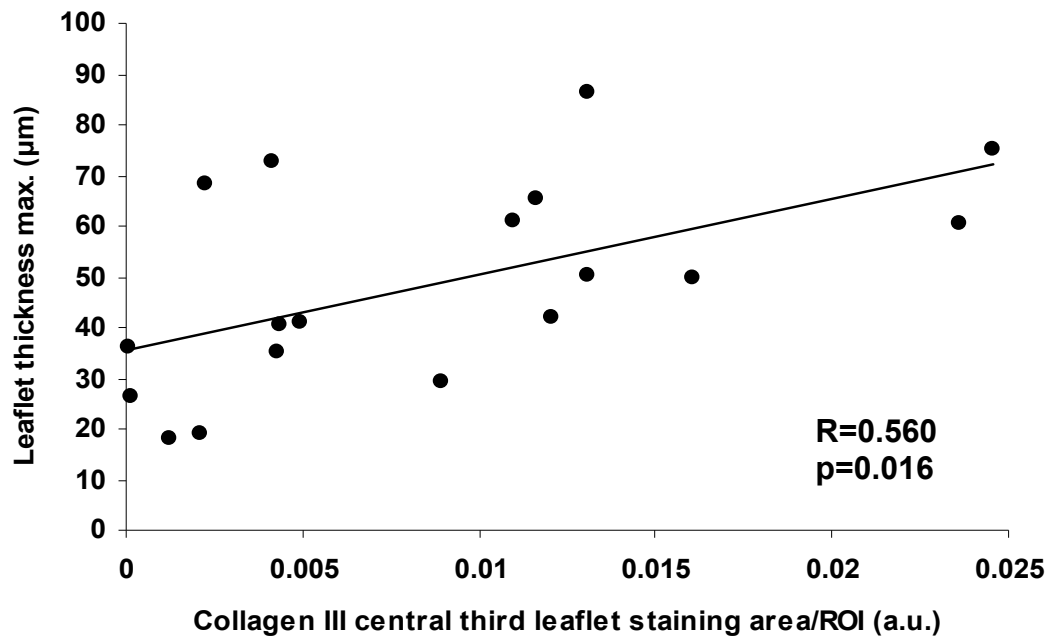


Figure 9. Correlation between the average of central third aortic valve leaflet type III collagen staining area/ROI and aortic valve leaflet maximal thickness from pooled groups ($n=18$).

S.6. Inflammation and evaluation of valvular endothelium integrity

AVS is the expression of early tissue damages mainly due to endothelium damages and inflammatory processes (Mazzone et al., 2007). Therefore we looked for signs of valvular endothelium dysfunction and inflammation. As indicated in Table 3, the plateletcrit (PCT) level in blood was significantly lower in *WrnΔhel* mice. Whereas the blood lymphocyte fraction (LYM, %) demonstrated a trend for a decrease in the *WrnΔhel* group, the granulocyte fraction (GRA, %) showed a trend for an increase in the same group, compared to the WT group (Table 3). However, IL-6 and TNF- α plasma levels were similar within the two groups (Table 3). A positive correlation between PCT and the change of AVA was found by pooling values from both groups ($r=0.830$, $p<.0001$, $n=16$) (Figure 10a).

Table 3. Inflammation parameters from blood analysis in WT and *WrnΔhel* mice

	PCT (10^{-2} l/l)	LYM (%)	GRA (%)	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
WT	0.38 ± 0.05	78.6 ± 4.7	9.1 ± 3.6	0.11 (0.00;1.37)	1.14 (0.56;1.71)
<i>WrnΔhel</i>	0.29 ± 0.06	73.0 ± 7.9	14.3 ± 6.8	0.19 (0.11;0.69)	0.56 (0.00;2.28)
p	0.011	0.093	0.061	0.752	0.499

For total blood PCT, LYM, and GRA, $n=11$ for WT and $n=5$ for *WrnΔhel*; statistical analyses were done with Student's t test for total blood analysis. For plasma IL-6 and TNF- α , $n=11$ for WT and $n=7$ for *WrnΔhel*; statistical analyses were done with a Mann-Whitney-Wilcoxon test for IL-6 and TNF- α plasma level.

Using immunohistochemistry, no change was observed for CD31 and SOD2 detection between the two groups, in contrast, eNOS detection demonstrated a trend for a decrease of the ratio of eNOS staining area/ROI (0.33 ± 0.18 in WT vs. 0.15 ± 0.18 in *WrnΔhel*; $p=0.051$) and for staining density reported on ROI (54.5 ± 30.7 in WT vs. 25.0 ± 30.3 in *WrnΔhel*; $p=0.059$) (representative eNOS immunohistochemical detection at Figure 11). Moreover, analysis of pooled data from both groups revealed a positive correlation between the change of AVA during the 24 weeks of the study and eNOS staining area reported on the aortic valve

annulus area ($r=0.59$, $p=0.010$) (Figure 10b). These findings are supported by the plasma analysis of nitrate levels for which the concentration was significantly lower in the $Wrm\Delta hel$ group ($1.01 \pm 0.26 \mu\text{M}$ in WT vs. $0.58 \pm 0.16 \mu\text{M}$ in $Wrm\Delta hel$; $p=0.005$).

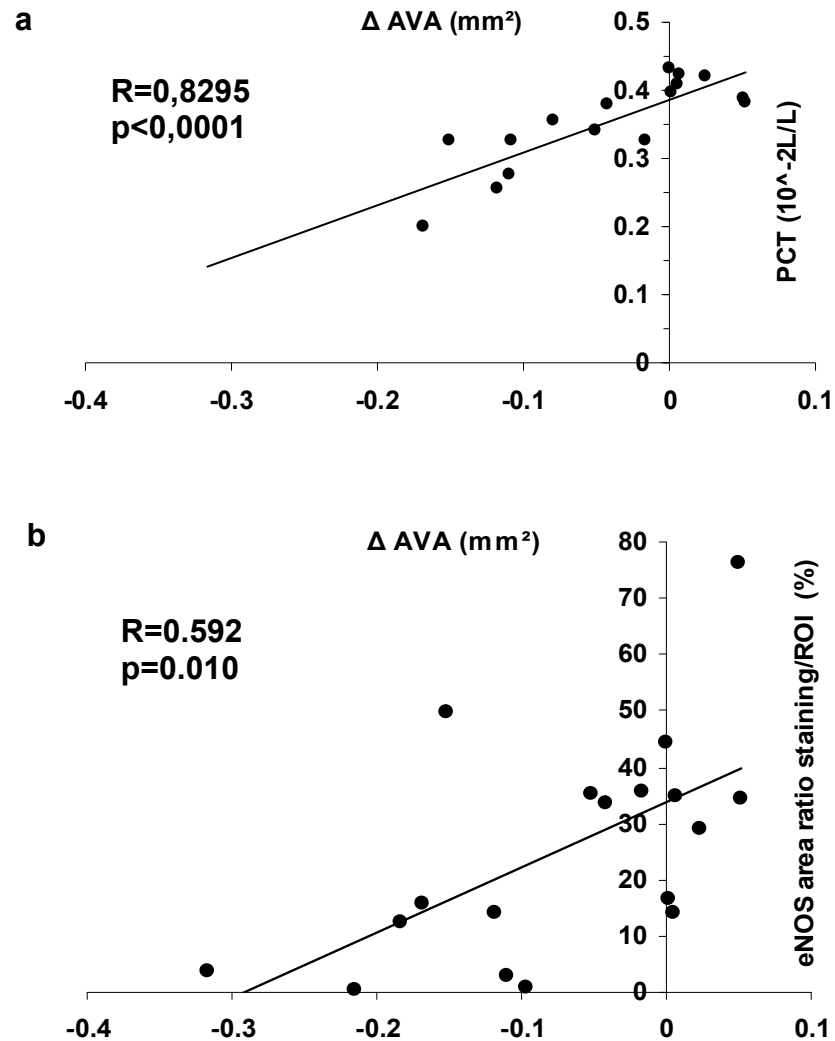


Figure 10. Correlation between the change over 24 weeks of high-fat/high carbohydrate diet of the aortic valve area (AVA) and a) plateletcrit (PCT) blood level from pooled data of both groups ($n=16$) or b) aortic valve leaflet eNOS area/ROI from pooled data of both groups ($n=18$).

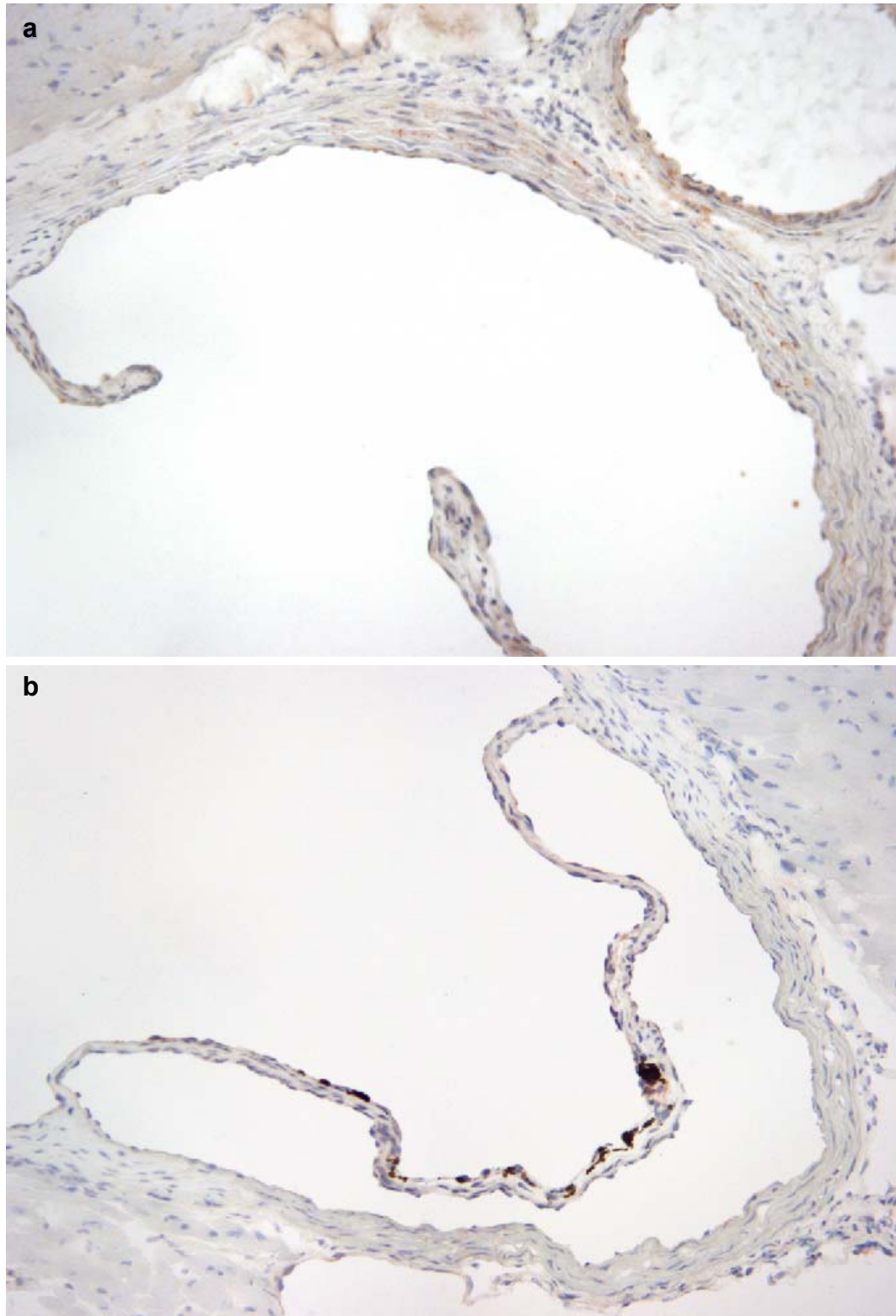


Figure 11. Immunohistochemical detection of eNOS in aortic valve leaflet cross sections (20x magnification) of a) WT and b) *Wrn* Δ hel mouse.

T. DISCUSSION

T.1. AVS characteristics in homozygous *Wrn* Δ hel mutant mice under high-fat/high-carbohydrate diet

Echocardiographic findings from our study showed that AVA decreased with time in *Wrn* Δ hel mice, and starting at week 16 of HF/HC diet, a significant decrease of AVA as compared to baseline was observed whereas AVA remained stable throughout the whole study course in the WT group under the same diet. In agreement with AVA progression, indications of LV hypertrophy, such as thicker LVAW and bigger LV mass, were also observed during the study course in the *Wrn* Δ hel group compared to the WT group. LVFS decrease over time was observed in both groups, but a correlation between the decreases of AVA and LVFS was only found for *Wrn* Δ hel mice, which could be related to the more severe AVS and/or LV systolic dysfunction in *Wrn* Δ hel mice. Our study thus describes the progressive establishment of mild AVS resulting in LV hypertrophy in *Wrn* Δ hel group. Indications of vascular disorders were also found in the *Wrn* Δ hel group compared to the WT group at the end of the experiment. Lower aS and PWV indicate deteriorations of vascular elasticity in *Wrn* Δ hel mice. It was already reported that decrease of aortic strain is associated with aging (Vaturi et al., 2003).

AVS was previously reported to develop in C57BL/6J mice after 16 weeks under the same diet (Drolet et al., 2006). However, it is known that some C57BL/6 substrains may respond differently to atherogenic diets. For instance, the genetic background of the mice we used was not based on C57BL/6J but instead on the C57BL/6C, for the WT control group and on C57BL/6N used for the backcrossing of *Wrn* Δ hel mice. Therefore our WT and *Wrn* Δ hel mice do not carry the exons 7-11 deletion of the nicotinamide nucleotide transhydrogenase (*Nnt*) gene as well as other genetic differences found at other loci in the C57BL/6J mice (Mekada et al., 2009). These genetic differences may explain the low susceptibility to develop AVS for our

WT mice. It is known for instance that *Nnt* deficiency leads to defective insulin secretion and inappropriate glucose homeostasis in male C57BL/6J mice (Freeman et al., 2006).

T.2. Low level of atherosclerosis in *WrnΔhel* mutant mice

After 24 weeks of HF/HC diet, although the total cholesterol levels were slightly elevated in both groups, we did not observe differences between *WrnΔhel* and WT mice in term of weight and lipid profile, except for the HDL-cholesterol level. These results indicate that the difference observed in the lipid metabolic profile between *WrnΔhel* and wild type animals is more obvious under a normal diet (Massip et al., 2006) than when these mice are fed with a HF/HC diet. No macroscopic atherogenic lesion could be observed in the aortas from both groups as well as no significant difference in aortic valve regarding macrophage and lipid infiltration or calcification was detected between groups, although both groups showed early signs of atherosclerosis at the microscopic level.

We believe that one of the main reasons to explain why we did not observe a stronger level of atherosclerosis in our mice was that the genetic background was not based on C57BL/6J, as mentioned above, and so these mice are probably more resistant to atherosclerosis. Also, it has been reported that cholic acid in rodent diet may accelerate the atherosclerosis process, independently of high levels of cholesterol in C57BL/6J mice (Nishina et al., 1993). However, although the HF/HC diet contains cholesterol (from lard), it is not enriched with cholate. This may have also contributed to the absence of fatty streak lesion observed after 24 weeks of HF/HC diet. Also, in the same study mentioned earlier, HDL-cholesterol was inversely related to fatty streak lesion area in C57BL/6J mice (Nishina et al., 1993). However, HDL-cholesterol plasma level was higher in *WrnΔhel* group than WT group and no fatty streak lesion was observed in either group of mice; indicating that the progressive AVS observed does not rely primarily on atherogenic events. Therefore, all these observations suggest that the *WrnΔhel* mice have developed AVS

without major signs of atherosclerosis, unlike the hyperlipidemic/hypervitaminosis D rabbit model previously used in our laboratory (Busseuil et al., 2008).

T.3. Aging-related observations in relation to development of mild AVS in *Wrn Δ hel* mutant mice

As mentioned above, we observed a higher level of HDL-cholesterol in the *Wrn Δ hel* group compared to the WT group. A recent study on elderly AVS patients compared to middle-aged AVS patients suggests a weaker contribution of lipid-related risk factors in the initiation and progression of AVS in the elderly population (Mohty et al., 2009). Also, it has been reported that cardiovascular disease (CAD) can occur in patients with high HDL levels, where the very high levels of HDL fails to provide the same “protective” benefit conferred by high HDL levels in individuals without CAD (DeFaria Yeh et al., 2007). Part of the explanation may be that there exists several HDL subspecies with differences in size, lipid and protein composition, and that some HDL subspecies have less anti-atherogenic properties (DeFaria Yeh et al., 2007). The higher plasma HDL-cholesterol level in our mouse aging model might be composed of a greater proportion of less protective HDL subspecies and may be related to some disturbance of normal HDL metabolism/catabolism caused by aging. On the other hand, it may be possible that AVS disease in the *Wrn Δ hel* model involves other mechanisms beyond the lipid model of atherosclerosis such as a different age-related metabolic risk profile which may be involved in the late development of AVS (Mohty et al., 2009).

Alterations of collagen and elastin fibers are involved in arterial stiffening associated with the aging process (Díez, 2007). Among others, elastin degradation and collagen synthesis contribute to aortic valve degeneration (Hakuno et al., 2009). Our results revealed no difference in aortic valve elastin and global collagen content between *Wrn Δ hel* and WT groups, however, we did observe more type III collagen in the leaflets, more precisely in the leaflets’ central thirds of *Wrn Δ hel* mice and this characteristic correlated positively with the leaflet thickness evaluated by histology.

Also we reported a trend for a negative correlation between type III collagen content in leaflets' central thirds and the change over time of AVA (data not shown). Consequently, these observations may link incipient fibrosis with age-related early stages of AVS. During tissue remodeling that occurs in the earliest stages of tissue repair, collagen molecules gradually replace granulation tissue and excessive type III collagen deposition is later on replaced by type I collagen (Gurtner et al., 2008). Also, since the collagen content in human heart increases with aging, it is possible that the thin fibers observed by Sirius Red staining are not always type III but instead type I collagen composing newly formed fibers which thereby appears like type III collagen (Gazoti Debessa et al., 2001). The difference of type III collagen (or thin fibers) content between groups might therefore result either from valvular shear stress or “wear and tear” in our age-related mouse model or from a direct aging fibrogenesis process in aortic valve. This second hypothesis is supported by the observed lower detection of MMP-9 in *Wrn* Δ *hel* aortic valves since MMP-9 expression decreases with age (Moon et al., 2004) and a lack of MMP-9 would increase collagen accumulation (Galis et al., 2002).

AVS appears to be a mixture of active atheroinflammation and aging processes. In our experiment, no difference in plasma IL-6 and TNF- α levels was detected between *Wrn* Δ *hel* and WT groups. However, a trend for an increase of granulocyte blood fraction was found in *Wrn* Δ *hel* mice compared to WT mice and may be related to the effect of aging on normal neutrophilia (Lord et al., 2001). Also, as platelets are part of inflammatory processes, we observed in our experiment a significant decrease of plateletcrit in *Wrn* Δ *hel* group compared to WT group. We also found in the same group a lower plasma nitrate level and a trend for decreased presence of eNOS in aortic valve annulus. Endothelial dysfunction is known to be related with aging and may be involved in AVS as well (Chenevard et al., 2006; Herrera et al., 2009; Ngo et al., 2007; Poggianti et al., 2003). Then, as we found positive correlations between the change of AVA and both plateletcrit and the ratio of eNOS-positive staining area over the aortic valve annulus area, we could hypothesize

that aging effects on NO-bioavailability and platelet count might affect the progression of AVS in our experimental murine model.

Finally, to complement our characterization of this mouse aging model of AVS, we also looked at indications of aging in bone marrow and its derived progenitor cells. We observed less bone marrow monoclear cells in *Wrn Δ hel* mice, which can be associated with aging since bone marrow cellularity decreases as we grow older (Compston, 2002). We also observed an increase of bone marrow mononuclear cell death in the *Wrn Δ hel* group compared to WT group. However, hematopoietic progenitor counts from bone marrow (hematopoietic progenitor colony formation units and KSL cell fraction) were higher in *Wrn Δ hel* mice. Similar results were reported for C57BL/6 mice where aged mice showed a somewhat paradoxical increase number of hematopoietic stem cell (HSC) from bone marrow (Sudo et al., 2000). It was suggested that expanded HSCs may have some sort of defect in maintenance of lymphoid lineage repopulating potential and may give rise to defective HSCs, which may ultimately commit to myeloid progenitor cells (Sudo et al., 2000). This hypothesis might also explain our observed lower lymphocyte but higher granulocyte ratio in blood, as well as the higher count of monocyte/macrophage progenitors (CFU-M) for *Wrn Δ hel* mice compared to WT. Since we found an higher mesenchymal progenitors count (colony formation from bone marrow, CFU-F) in *Wrn Δ hel* mice, it may be possible that a similar aging mechanism resulting in reduced adhesion to the stroma/niche might be involved in increased progenitor cells mobilization proficiency in aged mice (Xing et al., 2006). Therefore, aging influence bone marrow-derived cell proliferation and functions and it is also possible that aging indirectly affects stem and progenitor cells by acting on their microenvironment (Beauséjour, 2007). Furthermore, as prevalence of anemia increases with advancing age in human (Patel, 2008), the decrease of haemoglobin and hematocrit in *Wrn Δ hel* mice compared to WT mice also indicates that our aging model shows signs of accelerated aging. These changes in bone marrow may result in defective repair of aortic valve tissue and contribute to AVS.

In conclusion, *Wrn* Δ hel mutant mice on HF/HC diet could be used as an aging mouse model of mild AVS with low involvement of atherogenic events. Our results indicating decreased valvular endothelium integrity support this finding since both aging and AVS appear to be associated with endothelial dysfunction. We also observed typical age-related fibrogenesis in this experimental AVS model. Therefore, this mild AVS model with low atherosclerosis might prove to be useful to develop new therapies for AVS.

T.4. Study limitations

The length of the current study (24 weeks) might not have been long enough to observe stronger effects caused by the *Wrn* Δ hel mutation in relation to AVS. It is consequently possible that *Wrn* Δ hel mice would have developed more severe valve abnormalities after a longer follow-up.

ACKNOWLEDGMENTS

Dr J-C. Tardif holds the Canadian Institutes of Health Research and Pfizer chair in atherosclerosis. Dr. M.Lebel is a senior scholar of the *Fonds de la Recherche en Santé du Québec*.

U. REFERENCES

- 1 Carabello, B. & Paulus, W. Aortic stenosis. *Lancet* **373**, 956-966 (2009).
- 2 Aronow, W. Valvular aortic stenosis in the elderly. *Cardiol Rev* **15**, 217-225.
- 3 Guerraty, M. & Mohler Iii, E. Models of aortic valve calcification. *J Investig Med* **55**, 278-283 (2007).
- 4 Helske, S., Kupari, M., Lindstedt, K. & Kovanen, P. Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol* **18**, 483-491 (2007).
- 5 Yu, C. *et al.* Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* **272**, 258-262 (1996).
- 6 Capell, B., Collins, F. & Nabel, E. Mechanisms of cardiovascular disease in accelerated aging syndromes. *Circ Res* **101**, 13-26 (2007).
- 7 Chen, L. *et al.* WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair. *Aging Cell* **2**, 191-199 (2003).
- 8 Chen, L. & Oshima, J. Werner Syndrome. *J Biomed Biotechnol* **2**, 46-54 (2002).
- 9 Lebel, M. & Leder, P. A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13097-13102 (1998).
- 10 Massip, L. *et al.* Increased insulin, triglycerides, reactive oxygen species, and cardiac fibrosis in mice with a mutation in the helicase domain of the Werner syndrome gene homologue. *Exp Gerontol* **41**, 157-168 (2006).
- 11 Drolet, M., 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).
- 12 Busseuil, D. *et al.* Regression of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic peptide infusions in rabbits. *Br J Pharmacol* (2008).
- 13 Kassem, M. Stem cells: potential therapy for age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* **1067**, 436-442 (2006).

- 14 Rauscher, F. *et al.* Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* **108**, 457-463 (2003).
- 15 Vaturi, M. *et al.* Transthoracic echocardiographic assessment of proximal ascending aorta elasticity in familial heterozygous hypercholesterolemia patients. *Isr Med Assoc J* **5**, 475-478 (2003).
- 16 Yap, S. *et al.* Abnormal aortic elastic properties in adults with congenital valvular aortic stenosis. *Int J Cardiol* **128**, 336-341 (2008).
- 17 Mazzone, A., Venneri, L. & Berti, S. Aortic valve stenosis and coronary artery disease: pathophysiological and clinical links. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **8**, 983-989 (2007).
- 18 Mekada, K. *et al.* Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim* **58**, 141-149 (2009).
- 19 Freeman, H., Hugill, A., Dear, N., Ashcroft, F. & Cox, R. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes* **55**, 2153-2156 (2006).
- 20 Nishina, P. *et al.* Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. *J Lipid Res* **34**, 1413-1422 (1993).
- 21 Mohty, D. *et al.* Age-related differences in the pathogenesis of calcific aortic stenosis: The potential role of resistin. *Int J Cardiol* (2009).
- 22 DeFaria Yeh, D., Freeman, M., Meigs, J. & Grant, R. Risk factors for coronary artery disease in patients with elevated high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* **99**, 1-4 (2007).
- 23 Diez, J. Arterial stiffness and extracellular matrix. *Adv Cardiol* **44**, 76-95 (2007).
- 24 Hakuno, D., Kimura, N., Yoshioka, M. & Fukuda, K. Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease. *J Mol Med* **87**, 17-24 (2009).
- 25 Gurtner, G., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321 (2008).

- 26 Gazoti Debessa, C., Mesiano Maifrino, L. & Rodrigues de Souza, R. Age related changes of the collagen network of the human heart. *Mech Ageing Dev* **122**, 1049-1058 (2001).
- 27 Moon, S. *et al.* Age-related changes in matrix metalloproteinase-9 regulation in cultured mouse aortic smooth muscle cells. *Exp Gerontol* **39**, 123-131 (2004).
- 28 Galis, Z. *et al.* Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res* **91**, 852-859 (2002).
- 29 Lord, J., Butcher, S., Killampali, V., Lascelles, D. & Salmon, M. Neutrophil ageing and immunesenescence. *Mech Ageing Dev* **122**, 1521-1535 (2001).
- 30 Herrera, M., Mingorance, C., Rodríguez-Rodríguez, R. & Sotomayor, M. ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND AGING: AN UPDATE. *Ageing Res Rev* (2009).
- 31 Poggianti, E. *et al.* Aortic valve sclerosis is associated with systemic endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* **41**, 136-141 (2003).
- 32 Ngo, D., Heresztyn, T., Mishra, K., Marwick, T. & Horowitz, J. Aortic stenosis is associated with elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Nitric Oxide* **16**, 197-201 (2007).
- 33 Chenevard, R. *et al.* Persistent endothelial dysfunction in calcified aortic stenosis beyond valve replacement surgery. *Heart* **92**, 1862-1863 (2006).
- 34 Compston, J. Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol* **173**, 387-394 (2002).
- 35 Sudo, K., Ema, H., Morita, Y. & Nakauchi, H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **192**, 1273-1280 (2000).
- 36 Xing, Z. *et al.* Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. *Blood* **108**, 2190-2197 (2006).
- 37 Beauséjour, C. Bone marrow-derived cells: the influence of aging and cellular senescence. *Handb Exp Pharmacol*, 67-88 (2007).
- 38 Patel, K. Epidemiology of anemia in older adults. *Semin Hematol* **45**, 210-217 (2008).

DISCUSSION

V. SIGNES D'UNE SVA LÉGÈRE CHEZ LES SOURIS MUTANTES WRN Δ HEL

Il a été rapporté que les souris C57Bl/6 nourries à l'aide d'une diète riche en sucre et en gras développent plusieurs anomalies de la valve aortique comme une aire de valve plus petite, une vélocité transvalvulaire plus élevée, un épaissement des feuillets, une infiltration de lipides et de macrophages ainsi que des signes de calcification (Drolet et al., 2006). Également, les souris mutantes $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ de fond génétique C57bl/6 (modèle de vieillissement accéléré) peuvent développer des signes de SVA (Massip et al., 2006). Nous avons donc émis l'hypothèse que les souris mutantes $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ développeraient une SVA plus rapidement et/ou plus sévèrement que les souris de type sauvage (souris contrôles). Nos analyses échocardiographiques démontrent qu'en effet l'aire de la valve aortique (AVA) diminue dans le temps chez nos souris $Wrn\Delta hel$ puisqu'à partir de la semaine 16, en comparaison avec la semaine 0, cette diminution devient statistiquement significative; alors que l'AVA des souris contrôles reste stable tout au long de l'étude. Nous avons également remarqué que la paroi antérieure du ventricule gauche (LVAW) était plus épaisse et que la masse de ce ventricule (LVmass) était plus grande dans le groupe des souris $Wrn\Delta hel$ par rapport au groupe contrôle, menant à une indication d'hypertrophie du ventricule gauche en accord avec l'évolution de l'AVA. Aussi, la tendance observée d'une dimension du ventricule gauche en diastole (LVDd) plus large chez les souris $Wrn\Delta hel$ pourrait impliquer un élargissement potentiel du ventricule gauche. La décroissance dans le temps de la fraction de raccourcissement du ventricule gauche a aussi été observée chez les deux groupes à l'étude, mais une corrélation entre ce paramètre et l'AVA n'a été établie que chez les souris $Wrn\Delta hel$ indiquant qu'une dysfonction systolique du ventricule gauche plus sévère aurait pu apparaître dans ce groupe en prolongeant le temps d'expérimentation. Ces observations représentent une situation de SVA progressive instituant, au niveau du ventricule gauche, une hypertrophie et un élargissement potentiel dans le groupe

Wrn Δ hel. De plus, des indices de troubles vasculaires ont été détectés en fin d'étude chez les souris Wrn Δ hel, comparées aux souris contrôles. En effet, une plus basse vélocité au niveau de la paroi aortique postérieure (PWV) ainsi qu'un index de tension aortique (aS) inférieur indiquent une détérioration de l'élasticité vasculaire du groupe Wrn Δ hel (ce qui a déjà été rapporté dans la littérature), la diminution de l'aS étant associée au processus de vieillissement (Vaturi et al., 2003). Par conséquent, nous considérons que les souris Wrn Δ hel auraient développé une SVA significative mais à un stade précoce.

W. ABSENCE DE SIGNES ATHÉROGÉNIQUES ÉVIDENTS CHEZ LES SOURIS MUTANTES WRN Δ HEL

À la suite d'une diète riche en sucre et en gras (HF/HC) sur une période de 24 semaines, nous n'avons pas observé de différences entre les groupes Wrn Δ hel et contrôle pour les paramètres de poids des souris et de leur bilan lipidiques, à l'exception du niveau sanguin de cholestérol-HDL. Aucune lésion athérogénique (strie lipidique) n'a été détectée au niveau de l'aorte ainsi qu'aucune différence entre les groupes concernant l'infiltration de macrophages et de lipides ainsi que la calcification des tissus au niveau de la valve aortique n'a été observée. Il a été rapporté dans la littérature scientifique que l'utilisation de diètes riches en lipides additionnée d'acide cholique accélère le processus athérosclérotique chez les souris C57bl/6J, indépendamment du niveau de cholestérol sanguin (Nishina et al., 1993). Premièrement, comme la diète utilisée dans notre expérience est de composition faible en cholestérol (le lard est la source de gras qui contient 95 mg de cholestérol/Kg de lard et la diète en soi contient 385.5 g de lard/Kg de nourriture, aucune autre source de cholestérol n'a été ajoutée et donc le cholestérol représente 0.036 % en poids de la diète) et ne contient pas de cholate, cela expliquerait l'absence de plaque athéromateuses après 24 semaines de diète riche en gras. Aussi, l'étude de Nishina et al. démontre une relation inverse entre le niveau sanguin de HDL-cholestérol et l'aire des plaques athéromateuses. Nos résultats démontrent un niveau

plus élevé de cholestérol-HDL dans le groupe $Wrn\Delta hel$ par rapport au groupe contrôle sans que nous ayons détecté de plaques dans aucun des groupes de souris. Alors la progression de la SVA observée en échocardiographie pourrait ne pas être de nature athérogénique. Deuxièmement, Il semblerait que les souris C57bl/6J sont génétiquement différentes des autres souches C57bl/6. En effet, il existe au moins 12 polymorphismes de nucléotide simple (SNP) entre les sous-souches C57bl/6J (Jackson Laboratories) et C57bl/6N (National Institutes of Health) indiquant une différence génétique entre ces deux sous-souches (Mekada et al., 2009). Cette observation pourrait alors expliquer la différence entre nos résultats et ceux obtenus par Drolet et al. et Nishina et al. puisque nous n'avons pas utilisé des souris C57bl/6J dans notre étude mais des C57bl/6N (soit des C57bl/6NHsd pour les souris $Wrn\Delta hel$ et des C57bl/6Crl pour les souris contrôles). Par conséquent, toutes les observations suggèrent qu'il n'y a aucun signe évident d'infiltration de lipides au niveau de la valve et de l'aorte, ni aucun autre signe majeur d'athérosclérose. Nous pensons donc que nos souris $Wrn\Delta hel$ auraient développées une SVA non-athérogénique, contrairement au modèle SVA de lapin étudié dans notre laboratoire (Busseuil et al., 2008). Également, ces différences génétiques entre les différentes sous-souches pourraient expliquer la lente progression de la SVA dans notre étude.

X. OBSERVATIONS CONCERNANT LE VIEILLISSEMENT SUPPORTANT LES SIGNES DE SVA CHEZ LES SOURIS MUTANTES $WRN\Delta HEL$

Comme discuté plus haut, nous avons observé un niveau plus élevé de cholestérol-HDL chez les souris $Wrn\Delta hel$ comparativement aux souris contrôles. Une étude comparant des patients très âgés et des patients d'âge moyen, les deux groupes ayant développés une sténose aortique, suggère une faible contribution des lipides dans l'initiation et la progression de cette pathologie chez les patients plus âgés (Mohty et al., 2009). Une autre expérience confirme que les maladies cardiovasculaires apparaissent également chez des patients ayant de haut niveau de HDL où de très hauts niveaux de HDL ne fourniraient plus le même effet protecteur

conféré chez les individus sans maladie cardiovasculaire : il existe plusieurs variétés de HDLs (différentes tailles, densités et compositions) dont certaines ont des propriétés anti-athérogéniques moins efficace (DeFaria Yeh et al., 2007). Alors, notre modèle murin de vieillissement accéléré ayant un plus haut niveau de cholestérol-HDL que les souris contrôles posséderait en plus grande proportion une variété de HDLs moins athéro-protectrice, ce qui pourrait être le signe d'une perturbation du métabolisme des HDLs causé pas le vieillissement.

Les altérations du collagène et des fibres d'élastine entraînent le durcissement artériel relié au vieillissement (Diez, 2007). La dégradation de l'élastine et la synthèse de collagène contribuent à la dégénérescence de la valve aortique (Hakuno et al., 2009). Nos résultats n'ont révélé aucune différence entre les groupes à l'étude quant au contenu d'élastine au niveau de la valve aortique et de collagène total au niveau de la valve aortique. Par contre, nous avons observée plus de collagène de type III chez les *Wrn Δ hel* au niveau des feuillets de la valve aortique, plus précisément au niveau du tiers central des feuillets et ce paramètre corrèle positivement avec celui de l'épaisseur maximale des feuillets. De plus, nous avons observé une tendance quant à une corrélation négative entre le contenu en collagène de type III du tiers central des feuillets et le changement dans le temps de l'AVA (résultat non-présenté). Par conséquent, ces observations peuvent avoir un lien entre un début de fibrose et une SVA précoce. Durant le remodelage des tissus lésés, lors de la réparation tissulaire, des molécules de collagène sont synthétisées pour remplacer graduellement le tissu de granulation et le dépôt excessif de collagène III est remplacé au fur et à mesure par du collagène de type I (Gurtner et al., 2008). De même, puisque le contenu en collagène augmente dans le cœur humain en vieillissant, il est donc possible que les fibres minces de collagène observées par la coloration Sirius red ne soient pas toujours de type III mais du collagène I nouvellement formé qui est perçu également comme des fibres minces (Gazoti Debessa et al., 2001). Donc la différence observée du contenu en collagène III (ou fibres minces) entre les deux groupes pourrait provenir soit du stress « wear and tear » davantage présent chez le modèle murin de vieillissement, soit d'une fibrogénèse relative au vieillissement au niveau de la valve aortique. Cette

deuxième hypothèse est supportée par les observations faites du contenu moindre en MMP-9 des valves de souris *Wrn Δ hel* puisque l'expression de MMP-9 diminue avec l'âge (Moon et al., 2004) et qu'une carence en MMP-9 entraîne une accumulation de collagène (Galis et al., 2002).

La SVA est une pathologie associée à une inflammation active et au vieillissement. Notre étude démontre qu'il n'y a pas de différence des niveaux plasmatiques de TNF- α et d'IL-6 entre les groupes *Wrn Δ hel* et contrôle. Par contre, nous avons observé une tendance d'une fraction sanguine granulocytaire plus élevée chez les souris *Wrn Δ hel* qui pourrait être expliquée par l'observation rapportée de l'effet du vieillissement sur les neutrophiles humains et leur capacité chimiotactique défectueuse restreignant ainsi les neutrophiles à la lumière des vaisseaux sanguins (Lord et al., 2001). Aussi, une tendance quant à une fraction sanguine de lymphocytes moins élevée chez les mêmes souris a été soulevée. Ces observations ont déjà été remarqué dans plusieurs études démontrant que les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) sénescents ne génèrent plus de façon efficace les cellules de la lignée lymphoïde alors qu'elles supportent davantage la lignée myéloïde (Geiger and Rudolph, 2009). Comme nous n'avons remarqué, entre le groupe *Wrn Δ hel* et le groupe contrôle, aucune différence au niveau des marqueurs inflammatoires et qu'une tendance quant à la variation des cellules de l'inflammation. Nous continuons de penser que la SVA développée chez les souris *Wrn Δ hel* n'est qu'à un stade précoce de la maladie et seraient causée par le processus de vieillissement accéléré du modèle murin. De plus, nous savons que les plaquettes ont un rôle important dans le processus inflammatoire et nous avons remarqué, dans notre expérience, que la fraction du volume des plaquettes occupée dans le sang (plaquettecrité) était moins élevée chez les souris *Wrn Δ hel* que chez les souris contrôles. Nous avons également observé dans ce modèle murin de vieillissement un niveau de nitrate plasmatique plus bas, supporté par une tendance de présence d'eNOS moins prononcée au niveau de l'anneau de la valve aortique. Le déclin progressif de la fonction endothéliale, causé par le vieillissement et entraînant des maladies cardiovasculaire, est accompagné par le déséquilibre entre les molécules de vasoconstriction et vasodilatatrices produites

par l'endothélium, principalement la réduction progressive de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO·) (Herrera et al., 2009). Ainsi donc, ces observations pourraient être expliquées par le processus de dysfonction endothéliale, causé par le vieillissement, puisque nous avons observé une initiation de la SVA (et par le fait même une fibrose des feuillets de la valve supporté par la tendance d'une corrélation négative entre le collagène de type III au niveau du tiers central des feuillets et la concentration de nitrate plasmatique), conduisant à une diminution du NO· qui est un inhibiteur soluble d'activation de plaquettes. Privées de cet inhibiteur, plus de plaquettes pourraient être activées et, comme les lymphocytes, recrutée au site de lésion (Watson, 2009) diminuant leur présence dans la circulation systémique. Alors que nous avons trouvé une corrélation positive entre le changement de l'AVA dans le temps et les paramètres plaquettecrité ainsi que le ratio de marquage d'eNOS rapporté sur l'aire de l'anneau de la valve aortique, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'effet du vieillissement sur la biodisponibilité du NO· et sur l'activation des plaquettes serait en parti la cause des signes de la SVA observée dans cette étude (Chenevard et al., 2006; Ngo et al., 2007; Poggianti et al., 2003; Prohaska et al., 2008).

Enfin, comme nous étudions la progression de la SVA reliée au processus de vieillissement, nous avons également étudié ce processus au niveau des cellules progénitrices de la moelle osseuse. Les résultats obtenus démontrent qu'il y a moins de cellules dans la moelle osseuse des souris *Wrn Δ hel*, établissant un signe de vieillissement puisque la cellularité de la moelle osseuse décline avec l'âge (Compston, 2002). Nous avons aussi observé une augmentation de la mort cellulaire dans la moelle osseuse dans le groupe *Wrn Δ hel* en comparaison avec le groupe contrôle. Cette observation peut être reliée à un affaiblissement cellulaire dû au vieillissement et accentué par les manipulations pour effectuer les analyses. De plus, le compte de progéniteurs hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse (unités formatrices de colonie de progéniteurs hématopoïétiques et fraction cellulaire KSL) est plus élevé chez les souris *Wrn Δ hel*. Ces résultats coïncident avec d'autres expériences faites sur des souris C57bl/6 où celles qui étaient plus âgées démontraient

une augmentation du nombre de HSCs de la moelle osseuse (Sudo et al., 2000). Il a été évoqué qu'avec le temps, les HSCs qui se sont auto-renouvelées souvent puissent perdre leur capacité dans la maintenance de la lignée cellulaire lymphocytaire et produire aussi de nouvelles HSCs défectueuse (Sudo et al., 2000). Cette explication peut donc nous éclairer sur la diminution du ratio des lymphocytes et l'augmentation du ratio des granulocytes observées lors de l'analyse sanguine, ainsi que sur le compte plus élevé des progéniteurs de macrophages et monocytes (CFU-M) retrouvés dans le groupe $Wrm\Delta hel$; indiquant un signe de vieillissement au niveau des HSCs. Le processus de vieillissement des HSCs réduit leur adhésion à la stroma/niche et pourrait expliquer également l'augmentation de la mobilisation de ces cellules souches chez les souris âgées (Xing et al., 2006). De même, puisque nous avons observé un compte plus élevé de cellules progénitrices mésenchymateuses (CFU-F) chez les souris $Wrm\Delta hel$, nous pensons que ce même processus de vieillissement des HSCs affecterait ces progéniteurs fibroblastiques. Par conséquent, non seulement le vieillissement influencerait la prolifération et les fonctions de progéniteurs provenant de la moelle osseuse, mais il affecterait aussi directement les cellules souches en agissant sur leur microenvironnement (sénescence des tissus) (Beauséjour, 2007). Par ailleurs, la prévalence de l'anémie augmente avec l'âge chez les humains (Patel, 2008). La diminution des niveaux d'hémoglobine et de l'hématocrite au sein du groupe $Wrm\Delta hel$, par rapport au groupe contrôle, suggère que notre modèle murin de vieillissement démontre bel et bien un processus accéléré de vieillissement.

En conclusion, la SVA est une pathologie associée au vieillissement qui se développe lentement mais peut être détectée à un stade précoce par échocardiographie (Rosenhek and Baumgartner, 2008). Nous avons démontré que les souris mutantes $Wrm^{\Delta hel/\Delta hel}$ démontrent des signes de vieillissement et développent une SVA même si aucun évènement athérogénique majeur n'a été observé. Notre étude sur la dysfonction endothéliale supporte notre hypothèse puisque la SVA est associée à la dysfonction endothéliale systémique (Poggianti et al., 2003). De même, les données concernant la fibrose liée au vieillissement sont associées à la progression de la SVA dans cette expérience. Un modèle animal de SVA à un stade précoce et non-

athérogénique pourrait éventuellement permettre l'étude de plusieurs traitements pour ralentir ou même inverser la progression de cette pathologie, évitant ainsi le remplacement de la valve aortique en tant qu'intervention thérapeutique. Évidemment, plusieurs autres expériences doivent être exécutées pour mieux comprendre ce modèle murin de SVA associé à un vieillissement accéléré

Y. LIMITATIONS DE L'ÉTUDE

Suite aux analyses échocardiographiques, nous avons observé une SVA relativement légère au bout de 24 semaines d'expérience. Cependant, notre modèle murin de vieillissement aurait pu manifester davantage d'anormalités de la valve et autres signes d'une SVA plus sévère à plus long terme. Également, il a été impossible de faire les analyses sériques au temps 0 à l'aide des appareils d'analyses utilisés durant l'étude puisque la quantité de sang prélevé (200 ul par souris via la veine saphène selon les procédures normalisées de fonctionnement établies par le comité de déontologie de l'Institut de Cardiologie de Montréal) était insuffisante. Même en groupant le plasma des souris, le nombre d'échantillons était insuffisant pour les analyses statistiques.

Z. PERSPECTIVES EXPÉRIMENTALES

Le modèle murin de vieillissement exploité dans cette expérience doit faire l'objet d'expériences plus approfondies afin de mieux comprendre les mécanismes reliant la SVA et le vieillissement. Entre autre, sachant que l'hypertension est relié à la progression de la SVA, il serait intéressant étudier les paramètres hémodynamiques dans ce modèle expérimental. Aussi, notre laboratoire a exploité, sur un modèle expérimental de SVA chez le lapin, un peptide mimétique de l'ApoA-I qui a permis d'observer une régression de la SVA. De ce fait et suite aux observations échocardiographiques de notre étude établissant l'initiation d'une SVA chez les

souris $Wrm^{\Delta hel/\Delta hel}$, il sera intéressant d'étudier l'effet d'un traitement de peptide mimétique de l'ApoA-I dans ce modèle murin.

BIBLIOGRAPHIE

- Alexander, R. (1995). Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 25, 155-161.
- Aronow, W. Valvular aortic stenosis in the elderly. *Cardiol Rev* 15, 217-225.
- Aronow, W. (2007). Valvular aortic stenosis in the elderly. *Cardiol Rev* 15, 217-225.
- Artigou, J.-Y., Monsuez, J.-J., and Cardiologie, S.f.d. (2007). *Cardiologie et maladie vasculaires* (Paris, Masson).
- Baird, D., Davis, T., Rowson, J., Jones, C., and Kipling, D. (2004). Normal telomere erosion rates at the single cell level in Werner syndrome fibroblast cells. *Hum Mol Genet* 13, 1515-1524.
- Beauséjour, C. (2007). Bone marrow-derived cells: the influence of aging and cellular senescence. *Handb Exp Pharmacol*, 67-88.
- Boudoulas, H. (2003). Etiology of valvular heart disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 1, 523-532.
- Branch, K., O'Brien, K., and Otto, C. (2002). Aortic valve sclerosis as a marker of active atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep* 4, 111-117.
- Burhans, W., and Weinberger, M. (2007). DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res* 35, 7545-7556.
- Busseuil, D., Shi, Y., Mecteau, M., Brand, G., Kernaleguen, A., Thorin, E., Latour, J., Rhéaume, E., and Tardif, J. (2008). Regression of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic peptide infusions in rabbits. *Br J Pharmacol*.
- Capell, B., Collins, F., and Nabel, E. (2007). Mechanisms of cardiovascular disease in accelerated aging syndromes. *Circ Res* 101, 13-26.
- Carabello, B., and Paulus, W. (2009). Aortic stenosis. *Lancet* 373, 956-966.
- Chatterjee, A., and Catravas, J. (2008). Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol* 49, 134-140.

- Chen, L., Huang, S., Lee, L., Davalos, A., Schiestl, R., Campisi, J., and Oshima, J. (2003). WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair. *Aging Cell* 2, 191-199.
- Chen, L., and Oshima, J. (2002). Werner Syndrome. *J Biomed Biotechnol* 2, 46-54.
- Chenevard, R., Bechir, M., Hurlimann, D., Ruschitzka, F., Turina, J., Luscher, T., and Noll, G. (2006). Persistent endothelial dysfunction in calcified aortic stenosis beyond valve replacement surgery. *Heart* 92, 1862-1863.
- Chi, H., Messas, E., Levine, R., Graves, D., and Amar, S. (2004). Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. *Circulation* 110, 1678-1685.
- Compston, J. (2002). Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol* 173, 387-394.
- Cowell, S., Newby, D., Boon, N., and Elder, A. (2004). Calcific aortic stenosis: same old story? *Age Ageing* 33, 538-544.
- Crabbe, L., Verdun, R., Haggblom, C., and Karlseder, J. (2004). Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* 306, 1951-1953.
- Deb, A., Wang, S., Skelding, K., Miller, D., Simper, D., and Caplice, N. (2005). Bone marrow-derived myofibroblasts are present in adult human heart valves. *J Heart Valve Dis* 14, 674-678.
- DeFaria Yeh, D., Freeman, M., Meigs, J., and Grant, R. (2007). Risk factors for coronary artery disease in patients with elevated high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* 99, 1-4.
- Dhillon, K., Sidorova, J., Saintigny, Y., Poot, M., Gollahon, K., Rabinovitch, P., and Monnat, R.J. (2007). Functional role of the Werner syndrome RecQ helicase in human fibroblasts. *Aging Cell* 6, 53-61.
- Drolet, M., Roussel, E., Deshaies, Y., Couet, J., and Arsenault, M. (2006). A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *J Am Coll Cardiol* 47, 850-855.
- Díez, J. (2007). Arterial stiffness and extracellular matrix. *Adv Cardiol* 44, 76-95.

- Fehrer, C., and Lepperdinger, G. (2005). Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol* 40, 926-930.
- Feigenbaum, H., Armstrong, W.F., and Ryan, T. (2005). *Feigenbaum's Echocardiography*, 6e edition edn (Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins).
- Freeman, H., Hugill, A., Dear, N., Ashcroft, F., and Cox, R. (2006). Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes* 55, 2153-2156.
- Freeman, R., and Otto, C. (2005). Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 111, 3316-3326.
- Förstermann, U., and Münzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113, 1708-1714.
- Galis, Z., Johnson, C., Godin, D., Magid, R., Shipley, J., Senior, R., and Ivan, E. (2002). Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res* 91, 852-859.
- Gazoti Debessa, C., Mesiano Maifrino, L., and Rodrigues de Souza, R. (2001). Age related changes of the collagen network of the human heart. *Mech Ageing Dev* 122, 1049-1058.
- Geiger, H., and Rudolph, K. (2009). Aging in the lympho-hematopoietic stem cell compartment. *Trends Immunol* 30, 360-365.
- Gotto, A.M.J. (2004). *Contemporary Diagnosis and Management of Lipids Disorders*, third edn (Newtown, USA, handbook in Health Care Co.).
- Guerraty, M., and Mohler Iii, E. (2007). Models of aortic valve calcification. *J Investig Med* 55, 278-283.
- Gurtner, G., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321.

- Hakuno, D., Kimura, N., Yoshioka, M., and Fukuda, K. (2009). Molecular mechanisms underlying the onset of degenerative aortic valve disease. *J Mol Med* 87, 17-24.
- Hamburg, N.M., and Vita, J.A. (2004). Endothelial dysfunction in atherosclerosis : mechanisms of impaired nitric oxide bioactivity. In *Molecular mechanisms of atherosclerosis*, J. Loscalzo, ed. (Londre, Informa Healthcare, UK), p. 95.
- Handy, D.E., and Gavras, H. (2004). Hypertension and atherogenesis. In *Molecular mechanisms of atherosclerosis*, J. Loscalzo, ed. (Londre, Informa Healthcare, UK), p. 195.
- Harrington, J. (2000). The role of MCP-1 in atherosclerosis. *Stem Cells* 18, 65-66.
- Helske, S., Kupari, M., Lindstedt, K., and Kovanen, P. (2007). Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol* 18, 483-491.
- Herrera, M., Mingorance, C., Rodríguez-Rodríguez, R., and Sotomayor, M. (2009). ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND AGING: AN UPDATE. *Ageing Res Rev*.
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M., and Kihara, Y. (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73, 411-418.
- Jawień, J., Nastalek, P., and Korbut, R. (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55, 503-517.
- Jin, F., Kamanna, V., and Kashyap, M. (1997). Niacin decreases removal of high-density lipoprotein apolipoprotein A-I but not cholesterol ester by Hep G2 cells. Implication for reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2020-2028.
- Jones, D. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Kapur, N., Ashen, D., and Blumenthal, R. (2008). High density lipoprotein cholesterol: an evolving target of therapy in the management of cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag* 4, 39-57.
- Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295, 2446-2449.
- Kassem, M. (2006). Stem cells: potential therapy for age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 436-442.

- Kisseleva, T., and Brenner, D. (2008). Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med* (Maywood) *233*, 109-122.
- Kleemann, R., Zadelaar, S., and Kooistra, T. (2008). Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*.
- Korshunov, V., Schwartz, S., and Berk, B. (2007). Vascular remodeling: hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *27*, 1722-1728.
- Krimbou, L., Marcil, M., and Genest, J. (2006). New insights into the biogenesis of human high-density lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* *17*, 258-267.
- Kuhn, H., Chaitidis, P., Roffeis, J., and Walther, M. (2007). Arachidonic Acid metabolites in the cardiovascular system: the role of lipoxygenase isoforms in atherogenesis with particular emphasis on vascular remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol* *50*, 609-620.
- Kuusisto, J., Räsänen, K., Särkioja, T., Alarakkola, E., and Kosma, V. (2005). Atherosclerosis-like lesions of the aortic valve are common in adults of all ages: a necropsy study. *Heart* *91*, 576-582.
- Lebel, M., and Leder, P. (1998). A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 13097-13102.
- LeBoeuf, R., Doolittle, M., Montcalm, A., Martin, D., Reue, K., and Lusis, A. (1990). Phenotypic characterization of the Ath-1 gene controlling high density lipoprotein levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res* *31*, 91-101.
- Li, B., Jog, S., Reddy, S., and Comai, L. (2008). WRN controls formation of extrachromosomal telomeric circles and is required for TRF2DeltaB-mediated telomere shortening. *Mol Cell Biol* *28*, 1892-1904.
- Li, H., Wallerath, T., and Förstermann, U. (2002a). Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* *7*, 132-147.

- Li, H., Wallerath, T., Münzel, T., and Förstermann, U. (2002b). Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide* 7, 149-164.
- Libby, P., Bonow, R.O., Mann, D.L., Zipes, D.P., and Braunwald, E. (2008). *Braunwald's Heart Disease : a Textbook of Cardiovascular Medicine, Vol 2, 8 edn* (Philadelphia, PA, Elsevier Saunder).
- Linsel-Nitschke, P., and Tall, A. (2005). HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 4, 193-205.
- Lord, J., Butcher, S., Killampali, V., Lascelles, D., and Salmon, M. (2001). Neutrophil ageing and immunesenescence. *Mech Ageing Dev* 122, 1521-1535.
- Marcil, M., O'Connell, B., Krimbou, L., and Genest, J.J. (2004). High-density lipoproteins: multifunctional vanguards of the cardiovascular system. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2, 417-430.
- Marieb, E.N. (1999). *Anatomie et physiologie humaines, 2e edn* (Saint-Laurent, ERPI).
- Massip, L., Garand, C., Turaga, R., Deschênes, F., Thorin, E., and Lebel, M. (2006). Increased insulin, triglycerides, reactive oxygen species, and cardiac fibrosis in mice with a mutation in the helicase domain of the Werner syndrome gene homologue. *Exp Gerontol* 41, 157-168.
- Mazzone, A., Venneri, L., and Berti, S. (2007). Aortic valve stenosis and coronary artery disease: pathophysiological and clinical links. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 8, 983-989.
- Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y., and Yoshiki, A. (2009). Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim* 58, 141-149.
- Micheletti, R., Fishbein, G., Currier, J., Singer, E., and Fishbein, M. (2008). Calcification of the internal elastic lamina of coronary arteries. *Mod Pathol*.
- Minamino, T., and Komuro, I. (2007). Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res* 100, 15-26.

- Mohty, D., Pibarot, P., Després, J., Cartier, A., Arsenault, B., Picard, F., and Mathieu, P. (2009). Age-related differences in the pathogenesis of calcific aortic stenosis: The potential role of resistin. *Int J Cardiol*.
- Moon, S., Cha, B., Lee, Y., Nam, K., Runge, M., Patterson, C., and Kim, C. (2004). Age-related changes in matrix metalloproteinase-9 regulation in cultured mouse aortic smooth muscle cells. *Exp Gerontol* 39, 123-131.
- Movva, R., and Rader, D. (2008). Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clin Chem* 54, 788-800.
- Napoli, C., Nigris, F.d., Williams-Ignarro, S., Pignalosa, O., Sica, V., and Ignarro, L.J. (2006). Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Nitric Oxide* 15, 265–279.
- Ngo, D., Heresztyn, T., Mishra, K., Marwick, T., and Horowitz, J. (2007). Aortic stenosis is associated with elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Nitric Oxide* 16, 197-201.
- Nishina, P., Lowe, S., Verstuyft, J., Naggert, J., Kuypers, F., and Paigen, B. (1993). Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. *J Lipid Res* 34, 1413-1422.
- Opresko, P., Otterlei, M., Graakjaer, J., Bruheim, P., Dawut, L., Kølvrå, S., May, A., Seidman, M., and Bohr, V. (2004). The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell* 14, 763-774.
- Otto, C.M. (2009). *Textbook of Clinical Echocardiography*, 4e edition edn (Philadelphia, PA, Elsevier Saunder).
- Paigen, B., Mitchell, D., Reue, K., Morrow, A., Lusis, A., and LeBoeuf, R. (1987). Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3763-3767.
- Panzer, C., Ido, Y., and Ruderman, N. (2004). Diabetes mellitus as an atherogenic factor. In *Molecular mechanisms of atherosclerosis*, J. Loscalzo, ed. (Londre, Informa Healthcare, UK), p. 177.
- Patel, K. (2008). Epidemiology of anemia in older adults. *Semin Hematol* 45, 210-217.

- Pichierri, P., Franchitto, A., Mosesso, P., and Palitti, F. (2000). Werner's syndrome cell lines are hypersensitive to camptothecin-induced chromosomal damage. *Mutat Res* 456, 45-57.
- Pittenger, M., and Martin, B. (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95, 9-20.
- Poggianti, E., Venneri, L., Chubuchny, V., Jambrik, Z., Baroncini, L., and Picano, E. (2003). Aortic valve sclerosis is associated with systemic endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 41, 136-141.
- Prohaska, W., Zittermann, A., Lüth, J., Inoue, K., Köster-Eiserfunke, W., Baller, D., Körfer, R., and Kleesiek, K. (2008). Prevalent platelet dysfunction in patients with aortic valve disease. *J Heart Valve Dis* 17, 542-547.
- Rajamannan, N., Bonow, R., and Rahimtoola, S. (2007). Calcific aortic stenosis: an update. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4, 254-262.
- Ramaraj, R., and Sorrell, V. (2008). Degenerative aortic stenosis. *BMJ* 336, 550-555.
- Rauscher, F., Goldschmidt-Clermont, P., Davis, B., Wang, T., Gregg, D., Ramaswami, P., Phippen, A., Annex, B., Dong, C., and Taylor, D. (2003). Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* 108, 457-463.
- Rosenhek, R., and Baumgartner, H. (2008). Aortic sclerosis, aortic stenosis and lipid-lowering therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6, 385-390.
- Ruberg, F.L., and Loscalzo, J. (2004). Inflammation and atherothrombosis. In *Molecular mechanisms of atherosclerosis*, J. Loscalzo, ed. (Londre, Informa Healthcare, UK), p. 45.
- Schulz, E., Anter, E., and Keaney, J.J. (2004). Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr Med Chem* 11, 1093-1104.
- Sethe, S., Scutt, A., and Stolzing, A. (2006). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 5, 91-116.
- Sharpless, N., and DePinho, R. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 703-713.
- Solomon, S.D., Bulwer, B., and Libby, P. (2007). *Essential Echocardiographic* (Totowa, NJ, Humana Press).

- Spagnoli, L., Bonanno, E., Sangiorgi, G., and Mauriello, A. (2007). Role of inflammation in atherosclerosis. *J Nucl Med* 48, 1800-1815.
- Stassen, F., Vainas, T., and Bruggeman, C. (2008). Infection and atherosclerosis. An alternative view on an outdated hypothesis. *Pharmacol Rep* 60, 85-92.
- Stolzing, A., and Scutt, A. (2006). Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging Cell* 5, 213-224.
- Sudo, K., Ema, H., Morita, Y., and Nakauchi, H. (2000). Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192, 1273-1280.
- Suzu, S., Hiyoshi, M., Yoshidomi, Y., Harada, H., Takeya, M., Kimura, F., Motoyoshi, K., and Okada, S. (2007). M-CSF-mediated macrophage differentiation but not proliferation is correlated with increased and prolonged ERK activation. *J Cell Physiol* 212, 519-525.
- Tilly-Kiesi, M., and Tikkanen, M. (1992). Effects of lovastatin and gemfibrozil on high-density lipoprotein subfraction density and composition in patients with familial hypercholesterolemia. *J Lab Clin Med* 120, 103-110.
- Vaturi, M., Beigel, Y., Adler, Y., Mansur, M., Fainaru, M., and Sagie, A. (2003). Transthoracic echocardiographic assessment of proximal ascending aorta elasticity in familial heterozygous hypercholesterolemia patients. *Isr Med Assoc J* 5, 475-478.
- Visconti, R., Ebihara, Y., LaRue, A., Fleming, P., McQuinn, T., Masuya, M., Minamiguchi, H., Markwald, R., Ogawa, M., and Drake, C. (2006). An in vivo analysis of hematopoietic stem cell potential: hematopoietic origin of cardiac valve interstitial cells. *Circ Res* 98, 690-696.
- Watanabe, S., Yaginuma, R., Ikejima, K., and Miyazaki, A. (2008). Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol* 43, 509-518.
- Watson, S. (2009). Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis. *Curr Pharm Des* 15, 1358-1372.
- Whitman, S. (2004). A practical approach to using mice in atherosclerosis research. *Clin Biochem Rev* 25, 81-93.

- Wilson, P.W.F. (2004). The epidemiology of atherosclerotic disease. In *Molecular mechanisms of atherosclerosis*, J. Loscalzo, ed. (Londre, Informa Healthcare, UK), pp. 7-14.
- Xing, Z., Ryan, M., Daria, D., Nattamai, K., Van Zant, G., Wang, L., Zheng, Y., and Geiger, H. (2006). Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. *Blood* 108, 2190-2197.
- Yap, S., Nemes, A., Meijboom, F., Galema, T., Geleijnse, M., ten Cate, F., Simoons, M., and Roos-Hesselink, J. (2008). Abnormal aortic elastic properties in adults with congenital valvular aortic stenosis. *Int J Cardiol* 128, 336-341.
- Yu, C., Oshima, J., Fu, Y., Wijsman, E., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., *et al.* (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272, 258-262.
- Zannis, V.I., Kypreos, K.E., Chroni, A., Kardassi, D., and Zanni, E.E. (2004). Lipoproteins and atherogenesis. In *Molecular mechanisms of atherosclerosis*, J. Loscalzo, ed. (Londre, Informa Healthcare, UK), p. 123.
- Zhao, B., Li, Y., Buono, C., Waldo, S., Jones, N., Mori, M., and Kruth, H. (2006). Constitutive receptor-independent low density lipoprotein uptake and cholesterol accumulation by macrophages differentiated from human monocytes with macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF). *J Biol Chem* 281, 15757-15762.
- Zipes, D.P., Libby, P., Bonow, R.O., and Braunwald, E. (2005). Braunwald's heart disease : a textebok of cardiovascular medecine, Vol 1, 7 edn (Philadelphia, Pa, Elsevier Saunders).
- Zuliani, G., Vigna, G.B., and Fellin, R. (2007). The anti-atherogenic properties of HDL particles. In *International Congress Series* 1303, pp. 103–110.