UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

UFR des Sciences de Santé
Ecole doctorale « Environnement-Santé »
Equipe d'accueil 7460 - Laboratoire de Physiopathologie et d'Epidémiologie Cérébro-cardiovasculaires (PEC2)

Incidences de l'ischémie cérébrale sur la fonction et la sensibilité cardiaques à l'ischémie

Par Alexandre MÉLOUX

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Bourgogne-Franche-Comté
Spécialité : Physiologie

Dirigée par Catherine VERGELY et Yannick BEJOT

Présentée et soutenue publiquement à Dijon, le 11 Juin 2019

Composition du Jury :

Mr le Professeur Renaud TISSIER, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	Président
Mme la Docteure Elise BELAIDI-CORSAT, Université de Grenoble	Rapporteur
Mr le Professeur Bernard GENY, Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme la Professeure Catherine VERGELY, Université de Bourgogne	Codirectrice de thèse
Mr le Professeur Yannick BEJOT, Université de Bourgogne	Codirecteur de thèse

UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

UFR des Sciences de Santé
Ecole doctorale « Environnement-Santé »
Equipe d'accueil 7460 - Laboratoire de Physiopathologie et d'Epidémiologie Cérébro-cardiovasculaires (PEC2)

Incidences de l'ischémie cérébrale sur la fonction et la sensibilité cardiaques à l'ischémie

Par Alexandre MÉLOUX

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Bourgogne-Franche-Comté
Spécialité : Physiologie

Dirigée par Catherine VERGELY et Yannick BEJOT

Présentée et soutenue publiquement à Dijon, le 11 Juin 2019

Composition du Jury :

Mr le Professeur Renaud TISSIER, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort	Président
Mme la Docteure Elise BELAIDI-CORSAT, Université de Grenoble	Rapporteur
Mr le Professeur Bernard GENY, Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme la Professeure Catherine VERGELY, Université de Bourgogne	Codirectrice de thèse
Mr le Professeur Yannick BEJOT, Université de Bourgogne	Codirecteur de thèse

ÉCOLE DOCTORALE
Environnements - Santé
Bourgogne | Franche-Comté

Titre : Incidences de l'ischémie cérébrale sur la fonction et la sensibilité cardiaques à l'ischémie

Mots clés : Cœur, Cerveau, Infarctus du myocarde, Infarctus cérébral, Système nerveux autonome et Stress oxydant

Résumé : Pendant des années, les relations entre les événements ischémiques cardiaques et neurovasculaires ont été considérées comme étant liées à des mécanismes physiopathologiques similaires et à des facteurs de risque communs. Cependant, un accident vasculaire cérébral (AVC) aigu peut induire des changements importants de la fonction cardiovasculaire.
Le but de cette étude a été d'évaluer l'incidence de lésions ischémiques cérébrovasculaires sur la fonction du myocarde *in vivo* et *ex vivo*. En outre l'influence de ces lésions ischémiques cérébrales sur la vulnérabilité cardiaque aux lésions d'ischémie-reperfusion et sur l'expression cardiaque de gènes et de protéines impliquées dans les voies de cardioprotection a été appréciée.
Ainsi, dans notre travail, nous avons étudié la fonction cardiaque dans un modèle d'AVC induit par embolisation cérébrale chez le rat.
Les principaux résultats montrent que l'AVC 1/ altère la fonction cardiaque *in vivo* et *ex vivo*, 2/ altère la récupération du myocarde suite à une ischémie, 3/ implique le système nerveux autonome sympathique, 4/ implique le stress nitro-oxydant, 5/ altère une des voies de cardioprotection, 6/ implique le GDF15 au niveau cérébral et cardiaque.
L'AVC constituerait ainsi un facteur de mauvais pronostic cardiaque.

Title : Effects of cerebral ischemia on cardiac function and on sensitivity to ischemia

Keywords : Heart, Brain, Acute myocardial infarction, Cerebral infarction, Autonomic nervous system and oxidative stress

Abstract: For years, the relationship between cardiac and neurological ischemic events has been limited to overlapping pathophysiological mechanisms and common risk factors. However, acute stroke may induce dramatic changes in cardiovascular function.
The aim of this study was to evaluate how prior cerebrovascular lesions affect myocardial function and signaling in vivo and ex vivo, and how they influence cardiac vulnerability to ischemia-reperfusion injury and the expression of cardiac genes and proteins involved in cardioprotective pathways.
Thus, in our work, we studied cardiac function in a rat stroke model induced by cerebral embolization.
The main results show that experimental stroke 1/ impaired cardiac function both in vivo and ex vivo, 2/ impaired myocardial recovery following ischemia, 3/ involved sympathetic nervous system, 4/ involved nitro-oxidative stress, 5/ impaired one of the cardioprotective pathways, 6/ involved GDF15 at cerebral and cardiac levels.
Our findings indicate that stroke not only impairs cardiac contractility and also worsens myocardial vulnerability to ischemia. The underlying molecular mechanisms of stroke-induced myocardial alterations after cerebral embolization remain to be established insofar as they may involve the cytokine GDF-15.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement le **Professeur Catherine Vergely**, qui m'a accueilli dans son laboratoire lors de mes premiers pas dans la recherche. Elle m'a fait confiance dès le début de ce projet passionnant et elle a co-dirigé ce travail en me guidant grâce à ses qualités autant pédagogiques que scientifiques. Je lui suis reconnaissant pour tout le temps qu'elle m'a accordé et son sens du détail. Ses 4 années passées à ses côtés m'ont énormément appris.

Je souhaite remercier vivement le **Professeur Yannick Béjot** pour avoir co-dirigé ce travail. Votre disponibilité et vos conseils m'ont été d'une aide précieuse pour avancer dans la réalisation de ce projet. La possibilité que vous m'avez offerte de participer à des études cliniques m'a permis de faire une expérience très enrichissante. Ce fût un plaisir de travailler tout au long de cette thèse à vos côtés.

Je voudrais également sincèrement remercier le **Docteur Elise Bélaidi-Corsat** pour avoir accepté de juger ce travail.

Pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, je remercie le **Professeur Bernard Gény**.

Pour sa participation à mon comité de suivi de thèse et pour avoir accepté d'examiner ce travail, je remercie grandement le **Professeur Renaud Tissier**. Vos recommandations et encouragements m'ont permis d'avancer dans ce projet.

Je remercie le **Professeur Luc Rochette** pour avoir pris le temps de relire précisément ce travail. Votre bonne humeur communicative et votre bienveillance m'ont permis de travailler chaque jour dans les meilleures conditions. Je vous suis reconnaissant pour m'avoir transmis ne serait-ce qu'une infime partie de votre savoir.

Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.

Je dédie cette thèse

A mon Grand-Père,
Tu aurais été fier, tu es parti il y a peu
mais tu me manques terriblement.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX ____ *8*

ABBREVIATIONS ____ *11*

INTRODUCTION GENERALE ____ *13*

ETAT DE L'ART ____ *17*

I. Les cardiopathies ischémiques ____ **18**
1. Définition et épidémiologie ____ 18
2. Facteurs de risques ____ 18
3. Prise en charge aiguë de l'IDM ____ 21

II. Les accidents vasculaires cérébraux ____ **22**
1. Définition et épidémiologie ____ 22
2. Etiologies ____ 22
3. Facteurs de risques ____ 23
4. Prise en charge aiguë de l'AVC ischémique ____ 25

III. Incidences cardio-vasculaires de l'ischémie cérébrale d'un point de vue clinique ____ **27**
1. Etudes cliniques sur les conséquences cardiaques de l'AVC ____ 27
2. Relations entre les localisations de l'AVC et son impact sur le système cardiovasculaire ____ 29
3. Biomarqueurs potentiels dans d'AVC ____ 30
4. Mécanismes potentiellement impliqués dans les conséquences cardiaques de l'AVC ____ 32
5. Traitements envisageables afin de réduire l'impact cardio-vasculaire de l'AVC ____ 33

IV. Incidences cardio-vasculaires de l'ischémie cérébrale d'un point de vue expérimental ____ **36**
1. Facteurs influençant la réponse cardiovasculaires à l'ischémie cérébrale ____ 36
2. Influence de la localisation de l'infarctus cérébral sur l'impact cardiovasculaire de l'AVC ____ 37
3. Notion de protection par le pré-conditionnement ____ 38
4. Voies de signalisation potentiellement impliquées dans les conséquences cardiaques de l'ischémie cérébrale ____ 40
5. Traitements envisageables afin de limiter l'impact cardiovasculaire de l'ischémie cérébrale ____ 42

V. La cytokine growth differentiation factor 15 (GDF-15) ____ **45**
1. Classification, récepteur et voies de signalisation ____ 45
2. Synthèse, sécrétion, distribution et régulation ____ 47
3. GDF15 dans les pathologies cardiovasculaires ____ 51
4. GDF15 et AVC ____ 54

OBJECTIFS DE LA THESE ____ *56*

MATERIELS ET METHODES ____ *58*

I. Animaux ____ **59**

II. Modèle d'embolisation cérébrale ____ **59**

III. Evaluation du déficit neurologique, détermination de l'embolisation cérébrale et de la taille de l'infarctus ____ **60**

IV. Evaluation de la fonction cardiaque in vivo par échocardiographie ____ **61**

V. Evaluation de la fonction cardiaque ex vivo par la méthode de Langendorff ____ **62**

VI. Mesure de la vulnérabilité du myocarde aux lésions d'ischémie-reperfusion ex vivo ____ **63**

VII. Détermination des concentrations plasmatiques d'Ad, de NA et GDF15 ____ **63**

VIII. Réaction de polymérisation en chaine (PCR) quantitative en temps réel 63

IX. Western blot 65

X. Statistiques 66

RESULTATS *67*

I. L'embolisation cérébrale par des microsphères induit des infarctus cérébraux et des déficits neurologiques importants 68

II. L'embolisation cérébrale conduit à des dysfonctions cardiaques in vivo et ex vivo 68

III. L'embolisation cérébrale augmente la vulnérabilité cardiaque à l'ischémie-reperfusion ex vivo 70

IV. Les dysfonctions cardiaques après embolisation cérébrale sont associées à une augmentation des taux de catécholamines et de GDF15 dans la circulation 73

V. L'embolisation cérébrale altère la signalisation nitro-oxydante dans le cœur 75

VI. L'embolisation cérébrale altère l'expression myocardique d'ADRB1 et de la voie de cardioprotection SAFE 77

VII. L'embolisation cérébrale active l'expression du GDF15 au niveau cérébral et cardiaque. 79

DISCUSSION *82*

CONCLUSIONS *89*

BIBLIOGRAPHIE *91*

ANNEXES *113*

I. Liste des communications scientifiques 114

1. Publications 114
2. Communications orales 114
3. Communications affichées 115

II. Publications 118

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Schéma d'explication de la fibrillation atriale d'après Wakili et coll. (Wakili et al. 2011). A : Enregistrement électrocardiographique normal qui indique un rythme sinusal avec une initiation par le stimulateur du nœud sinusal, ce qui entraîne une activation auriculaire, suivie d'une conduction auriculo-ventriculaire via le nœud auriculo-ventriculaire, le faisceau de His et le réseau de Purkinje menant à une activation ventriculaire. B : Enregistrement ECG dans le cas d'une FA avec une activation atriale rapide et irrégulière, produisant une ligne de base onduleuse qui est visible lorsqu'elle n'est pas masquée par des ondes QRS et T plus grandes (l'activité auriculaire continue pendant cette phase. Au cours de la FA, une activité auriculaire rapide et non coordonnée conduit à une contraction auriculaire inefficace. Les activations ventriculaires (complexes QRS) maintenant dirigées par les oreillettes fibrillantes se produisent rapidement et irrégulièrement, affaiblissant l'efficacité de la contraction cardiaque et provoquant des symptômes cliniques. 16
Figure 2 : Evolution de la zone d'ischémie cérébrale en l'absence de recanalisation : la zone de pénombre (en gris) est peu à peu remplacée par une zone de nécrose (en noir). 25
Figure 3 : Schéma anatomique du cerveau humain (A) et du cerveau de rat (B)..... 30
Figure 4 : Voies de cardioprotection RISK et SAFE d'après Intachai et coll. (Intachai et al. 2018). 4E-BP1 : deux substrats canoniques de mTORC1, Akt : protéine kinase B, Bax : protéine Bcl2-associée à X, Bcl2 : cellules B de lymphome 2, cGMP : guanosine monophosphate cyclique, cGKI : protéine kinase de type I dépendante du cGMP, ERK : extracellular signal-regulated kinase, Fas : superfamille 6 des récepteurs au TNF, IL-6 : interleukine 6, IL-1β : interleukine 1β, JAK2 : Janus kinase 2, K_{ATP} : Canal potassique, MDA : malondialdehyde, MEK : protéine kinase activée par le mitogen/signal régulé extracellulaire kinase kinase, mPTP : pore de perméabilité mitochondrial, mTOR : cible mécanistique de la rapamycine, NF-κB : facteur nucléaire kappa B, NO : monoxyde d'azote, eNOS : NO synthase endothéliale, NOX : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxydase, OxPhos : Phosphorylation oxydative, p70S6K : ribosomal protein S6 kinase beta-1 de 70-kDA, pFOXO3a : phosphorylated forkhead box subfamily O3a, PGC1α : peroxisome proliferator-activated, pGSK-3β : phospho glycogen synthase kinase 3β, PI3K : phosphoinositide 3-kinase, PKC : protéine kinase C, p38MAPK : p38 mitogen-activated protein kinases, Ras : Serine kinase, Raf : threonine kinase, RISK: reperfusion injury savage kinase, ROS : Espèces réactives de l'oxygène, SAFE: survivor activating factor enhancement, SOD : superoxyde dismutase, sGC : guanylyl cyclase soluble, STAT3 : signal transducers and activators of transcription 3, TNFα : facteur de nécrose tumoral α, TNFR2 : Récepteur 2 au TNF, XO : Xanthine oxydase. 39
Figure 5 : Voies de signalisation du GDF15 : Akt : protéine kinase B, ALK4/5/7 et ALK1/2/3/6 : récepteurs au TGF-β de type 1, DAG : diacylglycérol, eNOS : NO synthase endothéliale, Erk : extracellular signal-regulated kinase, Erk MAPK : Erk mitogen-activated protein kinases, GFRAL : glial-derived neurotrophic factor-family receptor α-like, IP3 : inositol triphosphate, JNK : c-jun N-terminal kinases MKK : mitogen-activated protein kinase kinase, NF-κB : facteur nucléaire kappa B, NO : monoxyde d'azote, p160ROCK : protéine sérine/thréonine kinase, p38MAPK : p38 mitogen-activated protein kinases, p70S6K : ribosomal protein S6 kinase beta-1, PI3K : phosphoinositide 3-kinase, PLCγ : phospholipase C γ, PP2A : protéine phosphatase 2, Ras : Serine kinase, RET : corécepteur tyrosine-kinase, RhoA : Famille de gènes homologues de Ras, membre A, Smad : small mothers against decapentaplegic, TAK1/MEKK1 : mitogen-activated kinase kinase kinase, TBIR : récepteur au TGF-β de type 1, TBIIR : récepteur au TGF-β de type 2, TGF-β : transforming growth factor-β. 47
Figure 6 : Synthèse et sécrétion du GDF15. 48
Figure 7 : Schéma de régulation de l'expression du gène du GDF15 (inspiré de (Fujita et al. 2016) et (Ago and Sadoshima 2006)) : AINS : antiinflammatoires non stéroïdiens, Androg : androgène, AP-1 : protéine activatrice 1, ATF3 : facteur 3 activant la transcription, AVC : accident vasculaire cérébral, EGR1 : protéine de réponse de croissance précoce 1, HIF1α : facteur induit par l'hypoxie, IC : insuffisance cardiaque, IDM : infarctus du myocarde, IL : interleukine, KLF4 : facteur 4 de type kruppel, M-CSF : macrophage colony-stimulating factor, NF-κB : facteur nucléaire kappa B, p53 : protéine suppresseur de tumeur, PMA : phorbol myristate acetate (activateur de protéine kinase C), PPARγ : récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes, RA : récepteur aux androgènes, TGF-β : transforming growth factor-β, TNF : facteur de nécrose tumorale, UV : ultra-violette. 50
Figure 8 : Frise chronologique de l'évaluation de la fonction cardiaque in vivo par échocardiographie et mesure de la pression artérielle 62
Figure 9 : Frise chronologique des différentes expérimentations..... 66
Figure 10 : Impact de l'embolisation cérébrale. Score de déficit neurologique à 2 h, 24 h et 7 jours. 69
Figure 11 : Impact de l'embolisation cérébrale. A : Nombre calculé de microsphères après embolisation cérébrale (n=126). B : Volume d'infarctus cérébral (% de l'aire cérébrale totale) (n=19). 69

Figure 12 : Impact de l'embolisation cérébrale. Volume d'infarctus cérébral. 69
*Figure 13 : Fonction cardiovasculaire in vivo et ex vivo. A : Pression artérielle systolique après embolisation cérébrale à gauche ou à droite. B : Evolution de la fraction de raccourcissement du VG. * : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et les Sham et § : p<0,05 différence significative entre les AVC droits et les Sham. C : Pdev du cœur isolé perfusé de rat 2 h après embolisation cérébrale gauche ou droite pendant la première minute de perfusion basale (t0). D : Pdev du cœur isolé perfusé de rat 24 h après embolisation cérébrale gauche ou droite pendant la première minute de perfusion basale (t0). 70*
*Figure 14 : Evolution des paramètres fonctionnels des cœurs isolés perfusés, 2 h après embolisation ou non. A : Débit coronaire. B : Pdia. C : Pdev. D : -dP/dt. Les cœurs ont été perfusés pendant 10 minutes puis ont subi une ischémie globale totale de 30 minutes suivie d'une heure de reperfusion. * : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et les Sham, § : p<0,05 différence significative entre les AVC droits et les Sham et £ : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et droits au même temps de mesure en utilisant une ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées. 71*
*Figure 15 : Evolution des paramètres fonctionnels des cœurs isolés perfusés, 2 h après embolisation ou non. A : Débit coronaire. B : Fréquence cardiaque. C : Pdev. D : -dP/dt. Les cœurs ont été perfusés pendant 10 minutes puis ont subi une ischémie globale totale de 20 minutes suivie d'une heure de reperfusion. * : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et les Sham et § : p<0,05 différence significative entre les AVC droits au même temps de mesure en utilisant une ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées. 72*
*Figure 16 : Evolution des paramètres fonctionnels des cœurs isolés perfusés, 24 h après embolisation ou non. A : Pdev. B : -dP/dt. Les cœurs ont été perfusés pendant 10 minutes puis ont subi une ischémie globale totale de 20 minutes suivie d'une heure de reperfusion. * : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et les Sham et £ : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et droits au même temps de mesure en utilisant une ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées. 73*
*Figure 17 : Concentrations plasmatiques de catécholamines et de GDF15. A : Taux de catécholamines 2 h post-embolisation. B : Taux de catécholamines 24 h post-embolisation. *: p<0.05 versus sham group, **: p<0.01 versus sham group and ***: p<0.001 versus sham group. C : Taux de GDF15 2 h post-embolisation. D : Taux de GDF15 24 h post-embolisation. 74*
Figure 18 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression protéique au niveau cardiaque d'eNOS (A), de peNOS (B), de GPX1 (C) et de CAT (D) déterminée par western blot 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à la GAPDH. n=12 par groupe. 75
Figure 19 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression génique au niveau cardiaque d'eNOS (A), de GPX1 (B), de CAT (C) et d'ADRB1 (D) déterminée par PCR 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à la GAPDH. n=7 par groupe. 76
Figure 20 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression protéique au niveau cardiaque d'ADRB1 (A), de JAK2 (B), de STAT3 (C) et de pSTAT3 (D) déterminée par western blot 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à la GAPDH. n=12 par groupe. 78
Figure 21 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression génique au niveau cardiaque de JAK2 (A) et de STAT3 (B) déterminée par PCR 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à la GAPDH. n=7 par groupe. 79
Figure 22 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression génique de GDF15 au niveau du cortex homolatéral (A), du cervelet (B), du cortex controlatéral (C) et du cœur (D) déterminée par PCR 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à la GAPDH. n=8 par groupe. 80
Figure 23 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression protéique du ProGDF15 au niveau du cortex homolatéral (A), du cœur (B), du cortex controlatéral (C) et du GDF15 mature au niveau du cœur (D) déterminée par western blot 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à l'HPRT. n=9-10 par groupe sauf pour le cortex controlatéral ou n=5 pour les Sham, 6 pour les AVC gauches et 4 pour les AVC droits. 81
Figure 24 : Schéma de conclusion générale. Un accident vasculaire cérébral expérimental chez le rat, induit par une embolisation par des microsphères, conduit à une altération précoce (2H) et tardive (24H et 7 jours) de la contractilité cardiaque in vivo et ex vivo (cette dernière n'étant examinée qu'à 2H et 24H). Les voies de cardioprotection SAFE ont été altérées rapidement après l'AVC, de même que la signalisation du stress nitro-oxydant et l'expression de l'ADRB1. Des augmentations des taux de catécholamines et de GDF15 circulants ont été observées à 2H et 24H. De plus, des cœurs isolés ont été soumis à une ischémie globale réversible (20 minutes) ou irréversible (30 minutes) suivie d'une reperfusion, et une altération de la récupération des paramètres fonctionnels cardiaques a été observée ce qui semble démontrer une sensibilité accrue aux lésions d'ischémie-reperfusion du myocarde après un AVC. 88
Figure 25 : Interactions entre les différentes voies impliquées dans les incidences cardio-vasculaires de l'ischémie cérébrale. Le stress nitro-oxydant régule l'expression du GDF15, contribue aux voies de cardioprotection et

entraine des dysfonctions du SNA sympathique. Les ROS augmentent l'activité du SNA sympathique. Le GDF15 participe à la cardioprotection et s'oppose à la mort des neurones sympathiques. *88*

Tableau I : Amorces utilisées pour l'amplification des ARNm dans les tissus de rat *64*

ABBREVIATIONS

Ad : Adrénaline

ADRB1 : Récepteur β1-adrénergique

AIT : Accident ischémique transitoire

AVC : Accident vasculaire cérébral

BNP : Peptide natriurétique de type B

CAT : Catalase

CRP : Protéine C réactive

DC : Débit coronaire

Dkk-1 : Dickkopf-1

+dP/dt : Vitesse de contraction du VG

-dP/dt : Vitesse de relaxation du VG

ECG : Electrocardiogramme

eNOS : NO synthase endothéliale

FA : Fibrillation atriale

FC : Fréquence cardiaque

FIV : Fibrinolyse intraveineuse

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GDF15 : Growth Differentiation Factor 15

GFRAL : Glial-derived neurotrophic factor-family receptor α-like

GFL : Ligands de la famille des GDNFs

GFR α : GDNF family receptor α

GPX1 : Glutathion peroxydase 1

HIF : Facteur induits par l'hypoxie

HTA : Hypertension artérielle

IC : Insuffisance cardiaque

ICP : Intervention coronaire percutanée

IDM : Infarctus du myocarde

IEC : Inhibiteur de l'enzyme de conversion

IL : Interleukine

IMC : Indice de masse corporelle

IR : Insuffisance rénale

JAK2 : Janus kinase 2

MCAO : Occlusion de l'artère cérébrale moyenne

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1

MMP-9 : Matrix metallopeptidase 9 ou collagénase de type IV

NA : Noradrénaline

NCX : Echangeur Na^+/Ca^{2+}

NIHSS : National institute of health stroke scale

NO : Monoxyde d'azote

NT-proBNP : N-terminal-pro-Brain Natriuretic Peptide

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Réaction en chaine par polymérase

Pdev : Pression développée par le VG

Pdia : Pression télé-diastolique du VG

peNOS : Phospho-eNOS

PLB : Phospholamban

PLCγ : Phospholipase C

pSTAT3 : Phospho-STAT3

Psys : Pression télé-systolique du VG

PVP : Polyvinylpyrrolidone

RISK : Reperfusion injury salvage kinase

SAFE : Survivor activating factor enhancement

SCA : Syndrome coronaire aigu

SERCA2a : Ca2+-ATPase du réticulum sarco-endoplasmique

SHR : Rats spontanément hypertendus

Smad : Small mothers against decapentaplegic

SNA : Système nerveux autonome

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

t-PA : Facteur tissulaire du plasminogène

TBR : Récepteurs au TGF- β

TGF-β : Transforming growth factor-β

TNFα : Facteur de nécrose tumoral α

TTC : 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride

VG : Ventricule gauche

Wnt : Wingless-Int

INTRODUCTION GENERALE

En 2016, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 56,9 millions de décès ont eu lieu dans le monde, dont plus du quart (15,2 millions) étaient dus à des cardiopathies ischémiques et des accidents vasculaires cérébraux (AVC). Ces pathologies cérébro-cardiovasculaires constituent ainsi les principales causes de mortalité dans le monde depuis les 15 dernières années.

Les maladies cérébro-cardiovasculaires partagent des facteurs de risque communs comme l'hypertension artérielle (HTA), le diabète ou le tabagisme ainsi que des mécanismes physiopathologiques voisins que l'on peut relier à un contexte d'athérosclérose et d'athérothrombose. Outre ces caractéristiques communes, il existe de nombreuses interactions directes entre l'infarctus du myocarde (IDM) et l'AVC d'origine ischémique. Les patients qui présentent successivement un AVC et un IDM ont un risque vasculaire très élevé et un risque accru de mortalité précoce par rapport à ceux qui n'ont présenté qu'une seule de ces pathologies (Bejot et al. 2011). La fibrillation atriale (FA) est le plus fréquent des troubles du rythme cardiaque. Elle est définie par une activité électrique anarchique au niveau des oreillettes qui se traduit par une contraction désordonnée et inefficace, ainsi qu'une stagnation du sang dans la cavité auriculaire, qui est à l'origine de la formation de thrombi (Figure 1). On estime que 20% des AVC sont attribuables à la formation de caillots dans l'auricule gauche associés à un contexte de FA ; on parle d'AVC ischémiques d'origine cardio-embolique. La FA est ainsi responsable d'un risque multiplié par 5 de faire un AVC (European Heart Rhythm et al. 2010).

Il est donc particulièrement intéressant d'étudier l'évolution de la fréquence de survenue d'un AVC suite à un IDM : lors de leur hospitalisation pour un IDM, 1,4% des patients subissent un AVC et dans plus de 85% des cas il s'agit d'un AVC ischémique d'origine cardio-embolique (60%) (Hachet et al. 2014). Dans un travail ayant porté sur une période de 7 ans, il a été montré que des patients coronariens présentaient un risque augmenté de mortalité toutes causes, de mortalité cardiaque, d'IDM et d'AVC ischémique. Les patients les plus à risque d'AVC ischémique étaient ceux présentant une maladie vasculaire diffuse ou qui touchait plus de 3 vaisseaux. Dans ces deux situations, le risque relatif de développer un AVC ischémique était identique (Olesen et al. 2017). Une autre étude a évalué l'incidence des maladies cérébro-vasculaires après une angiographie coronaire. Elle a montré qu'un antécédent de pontage aorto-coronarien était un facteur de risque indépendant d'incidence d'AVC après une angiographie coronaire. Cette étude souligne le fait que l'AVC après une angiographie coronaire ne serait certainement pas dû à la procédure mais plutôt au contexte

athérosclérotique du patient, révélé par un antécédent de pontage aorto-coronarien (Tokushige et al. 2018). L'activité de certaines zones cérébrales, notamment des amygdales, peut prédire de manière indépendante la survenue de maladies cardiovasculaires car l'activité amygdalienne augmente l'activité 1/ de la moelle osseuse avec une augmentation de l'activité hématopoïétique ce qui conduit à une augmentation des globules blancs circulants, notamment des neutrophiles et des lymphocytes et 2/ de l'inflammation artérielle, ce qui fournit des informations nouvelles sur un des mécanismes potentiels par lesquels un stress émotionnel pourrait contribuer aux maladies cardiovasculaires (Tawakol et al. 2017). La fonction ventriculaire gauche contribue aussi de manière sensible à la pathogénèse de l'AVC ischémique dans le sens où le flux sanguin cérébral, dont la régulation vasculaire est perturbée par l'AVC, dépend de la fonction cardiaque. Ainsi, le débit sanguin cérébral au cours de l'AVC semble être plus élevé chez les patients ayant une fonction ventriculaire gauche préservée (Wira, Rivers, Silver, et al. 2011). Chez les patients présentant un syndrome de Takotsubo, dysfonction contractile du ventricule gauche (VG) qui prend la forme d'un ballon, 2,8% d'entre eux font un AVC dans les 30 jours et 4,2% dans l'année. Il semblerait qu'une anticoagulation orale soit nécessaire pendant 2 mois chez ces patients, ou jusqu'à récupération de la fonction ventriculaire. Cette anticoagulation permettrait de réduire le risque d'AVC d'origine cardio-embolique lié aux perturbations du flux sanguin dans la cavité ventriculaire gauche akinétique et dilatée par le syndrome de Takotsubo, qui favoriserait la formation de caillots intraventriculaires (Abanador-Kamper et al. 2018).

Si les accidents ischémiques cardiaques sont pourvoyeurs d'accidents ischémiques cérébraux (interactions cœur-cerveau), d'autres travaux ont montré qu'un évènement ischémique cérébral peut conduire à des perturbations de la fonction cardiaque (interactions cerveau-cœur). L'objectif de notre travail a été d'évaluer les interactions cerveau-cœur au cours des processus ischémiques.

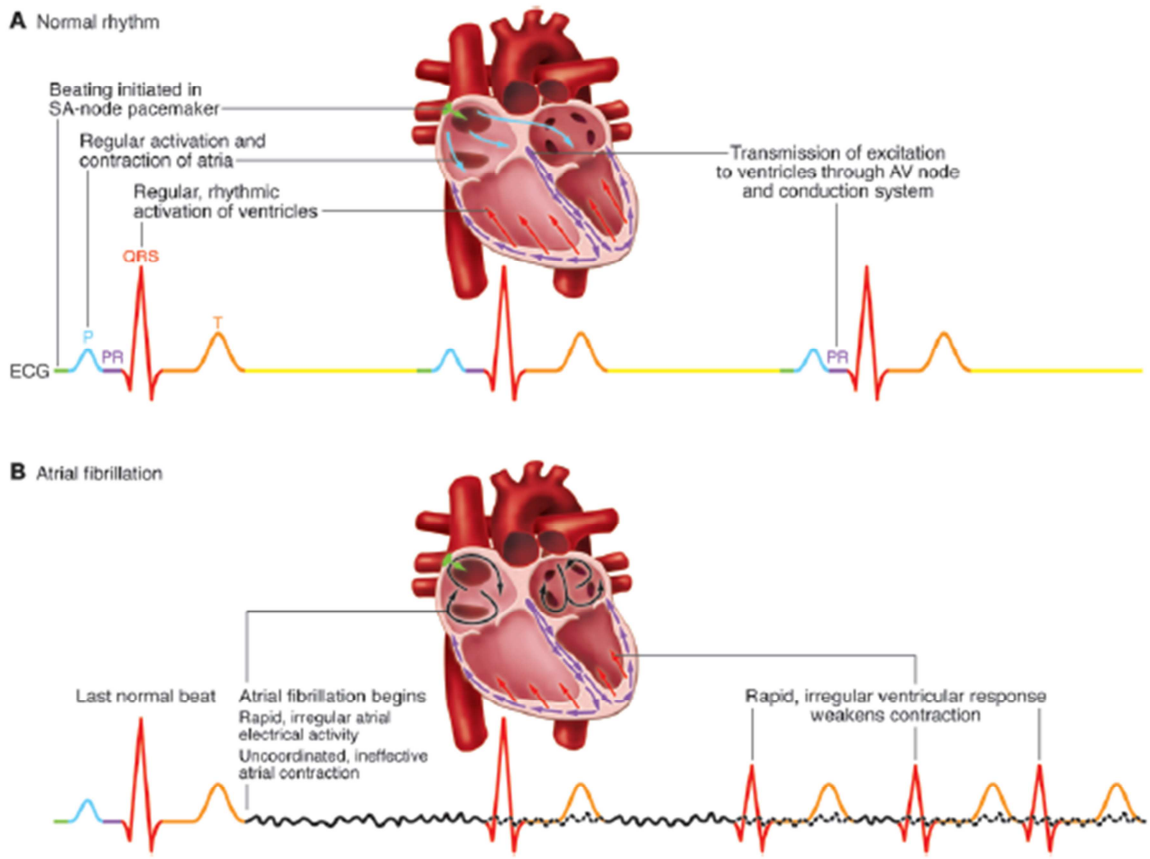


Figure 1 : Schéma d'explication de la fibrillation atriale d'après Wakili et coll. (Wakili et al. 2011). A : Enregistrement électrocardiographique normal qui indique un rythme sinusal avec une initiation par le stimulateur du nœud sinusal, ce qui entraîne une activation auriculaire, suivie d'une conduction auriculo-ventriculaire via le nœud auriculo-ventriculaire, le faisceau de His et le réseau de Purkinje menant à une activation ventriculaire. B : Enregistrement ECG dans le cas d'une FA avec une activation atriale rapide et irrégulière, produisant une ligne de base onduleuse qui est visible lorsqu'elle n'est pas masquée par des ondes QRS et T plus grandes (l'activité auriculaire continue pendant cette phase. Au cours de la FA, une activité auriculaire rapide et non coordonnée conduit à une contraction auriculaire inefficace. Les activations ventriculaires (complexes QRS) maintenant dirigées par les oreillettes fibrillantes se produisent rapidement et irrégulièrement, affaiblissant l'efficacité de la contraction cardiaque et provoquant des symptômes cliniques.

ETAT DE L'ART

I. Les cardiopathies ischémiques

1. Définition et épidémiologie

Les cardiopathies ischémiques, ou maladies coronariennes, sont définies comme un défaut d'apport en oxygène et nutriments au muscle cardiaque, le myocarde, via le rétrécissement ou l'obstruction des artères coronaires. L'étiologie principale de ces maladies coronariennes est l'athérosclérose. Cette dernière est une maladie inflammatoire et métabolique des artères qui conduit à la perte d'élasticité du vaisseau et à l'épaississement de la paroi artérielle due à l'accumulation, dans la paroi interne de l'artère (intima), de lipides et d'une chape fibreuse qui vont aboutir à la formation d'une plaque d'athérome constituée. La présence de cette plaque entraine une diminution progressive de la lumière artérielle (sténose) qui peut aller jusqu'à l'obstruction complète du vaisseau. L'érosion et la déstabilisation de la plaque entrainent la formation d'un thrombus (athérothrombose) plus ou moins occlusif, qui conduit à l'ischémie des territoires situés en aval de l'artère. Au niveau cardiaque, il s'agit du syndrome coronarien aigu, qui peut conduire à la nécrose du tissu observée lors de l'IDM : c'est la « crise cardiaque ». Cette pathologie représente environ 120 000 cas par an en France. L'âge moyen de survenue d'un IDM est de 68 ans. Plus de 40% des patients hospitalisés pour un IDM ont moins de 65 ans.

2. Facteurs de risques

Il existe de nombreux facteurs de risque des cardiopathies ischémiques.

Certains facteurs ne sont pas modifiables, c'est le cas de :

- ✓ L'âge : > 50 ans chez l'homme et > 60 ans chez la femme.
- ✓ Du sexe : avant 70 ans, la majorité des IDM surviennent chez l'homme mais cette différence diminue après la ménopause et disparait complètement après 80 ans (Boyer et al. 2012).
- ✓ De l'hérédité : lorsqu'il existe des antécédents familiaux de maladies cardiovasculaires, coronaires, d'AVC ou de mort subite avant 55 ans chez un ou plusieurs parents du premier degré de sexe masculin et avant 65 ans chez un ou plusieurs parents du premier degré de sexe féminin.

D'autres facteurs de risque, liés à l'environnement ou au mode de vie, sont modifiables :

- ✓ Tabagisme : le risque de faire un IDM est huit fois plus élevé chez une fumeuse jeune et cinq fois plus élevé chez un fumeur jeune que chez un non-fumeur (Tolstrup et al. 2014). Ce risque augmente avec la quantité de tabac consommé par jour (Yusuf

et al. 2004). L'arrêt du tabac exerce un effet bénéfique sur le risque d'IDM. En effet, le risque d'un nouvel IDM diminue de moitié 1 an après l'arrêt du tabac et disparait complètement à 5 ans (Abdendi 2002). Il est donc nécessaire de convaincre les patients d'arrêter de fumer le plus tôt possible.

- ✓ Dyslipidémie : le risque de faire un IDM est trois fois plus élevé chez une personne qui présente un taux de LDL-cholestérol > 1,6 g/L (Grundy et al. 2004). C'est l'inverse pour le HDL-cholestérol, qui est considéré comme un facteur de risque s'il est < 0,4 g/L. Il existe une corrélation négative entre le taux de HDL-cholestérol et la survenue d'un IDM (Gordon et al. 1977). L'objectif des traitements nutritionnels et/ou médicamenteux consiste à diminuer les taux de LDL-cholestérol et à augmenter ceux du HDL-cholestérol. Le traitement débute avec des mesures hygiéno-diététiques auxquelles, si elles sont insuffisantes, on ajoute une thérapie par statines. Une étude a montré qu'un traitement par atorvastatine en phase aiguë d'IDM réduisait le risque relatif de récidive d'IDM et d'hospitalisation de 26%, sans conséquence sur la mortalité (Schwartz et al. 2001).
- ✓ HTA : elle est définie par des valeurs de pression systolique > 140 mmHg et de pression diastolique > 90 mmHg. Il existe une corrélation positive entre les chiffres de pression artérielle et le risque de mortalité due à une cardiopathie ischémique dès les valeurs de 115/75 mmHg (Lewington et al. 2002). Il est nécessaire de traiter toute HTA par des mesures hygiéno-diététiques plus ou moins associées à un traitement médicamenteux. Il existe de nombreuses classes d'antihypertenseurs comme les β-bloquants, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), les antagonistes de l'angiotensine II, les inhibiteurs calciques, les diurétiques, … Le traitement de l'HTA réduit le risque de maladies cardio-vasculaires de 14% (Collins et al. 1990).
- ✓ Diabète de type 2 : il est défini par une glycémie à jeun > 1,26 g/L. L'IDM est 2 à 3 fois plus fréquent chez les hommes diabétiques et 3 à 5 fois plus fréquent chez les femmes diabétiques (Kannel and McGee 1979) (Yusuf et al. 2004). Il est nécessaire de contrôler la glycémie des patients diabétiques par des traitements antidiabétiques oraux tels que la metformine, les sulfamides hypoglycémiants, les glinides, les inhibiteurs d'alpha-glucosidase, ou par l'administration d'insuline. Il a été montré qu'un traitement intensif du diabète par insuline et sulfamides hypoglycémiants avait tendance à réduire de 16% le risque d'IDM et que la metformine diminuait le risque d'IDM de presque 40% ('Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients

with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group' 1998) ('Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group' 1998).

- ✓ L'obésité : elle est définie par un indice de masse corporelle (IMC) > 30 kg/m². On parle d'obésité morbide lorsque que l'IMC dépasse 40 kg/m². Le risque cardiovasculaire est corrélé avec l'IMC d'autant plus que cette obésité est de type androïde (tour de taille > 88 cm chez la femme, > 102 cm chez l'homme). Un patient obèse à environ 2 fois plus de risque de faire un IDM, qui survient plus tôt (Yusuf et al. 2004) (Suwaidi et al. 2001). Une perte de poids conduisant à un IMC < 28 kg/m² permet de réduire la mortalité cardiovasculaire d'environ 50% et la réduction va même jusqu'à 77% si le patient est hypertendu (Wannamethee and Shaper 1990).
- ✓ La sédentarité : elle est définie par l'OMS comme un manque d'activité physique. De nombreux travaux indiquent que la sédentarité est associée à une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires et de la mortalité (Diaz et al. 2017). Courir, même quelques minutes par jour (< 10 min) et à faible vitesse (< 10 km/h), permet de réduire la mortalité cardiovasculaire (Lee et al. 2014). Chez des patients coronariens stables, la pratique d'une activité physique était associée à une diminution de la mortalité (Stewart et al. 2017). Il existe une relation en U entre l'intensité de l'exercice physique et la mortalité cardiaque ; en effet, un exercice modéré s'avère bénéfique par rapport à la sédentarité mais un exercice intense peut à l'inverse se révéler nocif (Merghani, Malhotra, and Sharma 2016).
- ✓ Le stress : c'est un facteur de risque d'IDM. Une étude suédoise a montré que les hommes et les femmes exerçant des emplois stressants présentent un risque relatif plus élevé d'IDM que les personnes ayant un emploi non stressant (Hammar, Alfredsson, and Johnson 1998). Une autre étude qui combine 2 questionnaires de stress montre des odds ratio accrus d'infarctus chez les hommes de 45 à 64 ans après ajustement sur l'HTA, le cholestérol, le diabète, l'existence d'antécédents familiaux cardiovasculaires, le tabac, l'IMC et le niveau d'activité physique (Peter et al. 2002). Une méta-analyse souligne le fait que la prévention du stress en milieu professionnel pourrait réduire l'incidence des IDM (Kivimaki et al. 2012).

3. Prise en charge aiguë de l'IDM

Le traitement d'urgence de l'IDM consiste en la revascularisation la plus précoce possible du territoire ischémié. En effet, la nécrose myocardique, qui correspond à la mort du tissu, débute après 20 minutes d'occlusion coronaire. Pour ce faire, il existe différentes techniques :

- ✓ La reperfusion mécanique par intervention coronaire percutanée (ICP) ou angioplastie coronaire, qui consiste à dilater, grâce à un ballonnet, la coronaire impliquée pour reperfuser le territoire en aval de l'obstruction. La mise en place d'un stent qui va permettre le maintien de l'ouverture du vaisseau incriminé est possible avec cette technique.
- ✓ La reperfusion chimique par fibrinolyse intraveineuse (FIV) qui consiste à dégrader le caillot de fibrine avec des agents fibrinolytiques (Altéplase et Ténectéplase).

Le choix du traitement dépend du délai suivant le début de la douleur. Si le délai est < 90 minutes, une ICP sera priorisée et si le délai est > 90 minutes une FIV sera entreprise. Une ICP secondaire peut être réalisée en cas d'échec de la FIV si le délai est < 12 heures.

II. Les accidents vasculaires cérébraux

1. Définition et épidémiologie

Les AVC peuvent être de deux types, les AVC ischémiques qui correspondent à l'occlusion d'un vaisseau cérébral par un caillot pouvant provenir par exemple d'une plaque d'athérome et les AVC hémorragiques qui coïncident avec la rupture d'une artère cérébrale. Les AVC ischémiques représentent la grande majorité des AVC (environ 80%) tandis que les AVC hémorragiques représentent 20% de ces atteintes cérébrales. Les AVC ischémiques atteignent même la proportion de 87% dans la population américaine (Writing Group et al. 2016). Ils touchent plus de 150 000 patients par an en France. Dans plus de 75% des cas les AVC affectent des patients âgés de plus de 65 ans. L'âge moyen de survenue d'un AVC est de 73 ans (Bejot 2007). La suite de cette partie introductive bibliographique portera uniquement sur l'AVC de type ischémique.

2. Etiologies

Les principales étiologies de l'AVC ischémique sont :

- ✓ Une atteinte des grosses artères (macroangiopathies) par l'athérosclérose qui représente environ 30% de l'ensemble des infarctus cérébraux. Il existe aussi un certain nombre de cas de lésions liées à une dissection des artères cervico-encéphaliques, qui correspond à une rupture de la tunique artérielle suivie du développement d'un hématome au sein de la paroi de l'artère, ce qui entraine une sténose. Les cas de dissection correspondent à la cause la plus fréquente d'AVC chez le sujet jeune.
- ✓ Une atteinte des petites artères (microangiopathies) avec les infarctus lacunaires qui représentent 20% des AVC. Ils correspondent à des petits infarctus de diamètre < 15 mm dus à l'occlusion d'une artériole profonde dont le principal facteur de risque est l'HTA.
- ✓ Les cardiopathies emboligènes, ou AVC cardio-emboliques, correspondent à environ 20% des AVC. Elles surviennent chez des patients présentant des atteintes morphologiques ou fonctionnelles du muscle cardiaque, comme par exemple la FA, et qui favorisent le risque de formation de thrombi potentiellement emboligènes.
- ✓ Les causes inconnues, qu'on nomme AVC cryptogéniques, représentent environ ¼ des AVC.

3. Facteurs de risques

Les facteurs de risques de l'AVC sont sensiblement les mêmes que ceux de l'IDM. Certains facteurs ne sont pas modifiables, il s'agit de :

- ✓ L'âge : Le risque de faire un AVC ischémique augmente avec l'âge. Ces dernières années, on constate néanmoins une hausse de la proportion des AVC chez les moins de 55 ans.
- ✓ Du sexe : Contrairement à l'IDM, où le risque est plus faible chez les femmes, le risque d'AVC ischémique est identique dans les deux sexes.
- ✓ De l'hérédité : Le risque d'AVC est plus élevé si un parent a eu un AVC avant 65 ans.

A l'inverse, d'autres facteurs de risques, liés au mode de vie ou à l'environnement, sont modifiables :

- ✓ Le tabagisme est un facteur de risque d'AVC qui a été démontré dans de nombreuses études (Shah and Cole 2010). Ce risque est positivement corrélé à l'intensité de la consommation de tabac, le risque relatif étant plus important chez les patients ayant une forte consommation (> 40 cigarettes/jour) que chez ceux ayant une consommation plus faible (< 10 cigarettes/jour). Le risque d'AVC diminue significativement dès 2 ans après l'arrêt du tabagisme et est au même niveau que les non-fumeurs 5 ans après l'arrêt (Wolf 1998). Il a été montré récemment que le tabagisme pouvait affecter l'expression et la fonction de certains transporteurs dans les unités neurovasculaires, structure conceptuelle qui est engagée dans le maintien de l'homéostasie du système nerveux central, et que ces dérégulations pouvaient aggraver les conséquences de l'AVC ischémique (Sifat et al. 2018).
- ✓ Les dyslipidémies sont significativement associées à une augmentation du risque d'AVC (Nguyen et al. 1997). L'étude SPARCL a montré que la récurrence d'un AVC ischémique pourrait être améliorée par un traitement avec de l'atorvastatine à dose élevée (80 mg/j) par rapport à des patients non traités (Goldstein et al. 2009) (Huisa, Stemer, and Zivin 2010). Les statines ont prouvé leur utilité pour diminuer l'incidence des AVC chez les patients à haut risque athérosclérotique (Meschia et al. 2014) (Baigent et al. 2005) (Amarenco et al. 2009).
- ✓ L'obésité et le surpoids chez le jeune adulte sont également associés à une augmentation du risque de survenue d'un AVC et l'effet s'accroit avec l'augmentation du de la masse pondérale (Guo et al. 2016).

- ✓ L'HTA est le plus puissant facteur de risque des AVC, qu'ils soient ischémiques ou hémorragiques (Collins and MacMahon 1994). Une pression artérielle élevée, de même qu'à l'inverse une pression artérielle trop basse, sont des facteurs prédictifs indépendants de mauvais pronostic. Chaque augmentation de pression artérielle systolique de 10 mmHg (si > 150 mmHg) augmente le risque de décès précoce de 3,8% et de récurrence d'AVC ischémique dans les 14 jours qui suivent de 4,2% (Leonardi-Bee et al. 2002). Il est recommandé de traiter cette HTA car cela conduit à une réduction de plus de 40% du risque de récidive (Collins et al. 1990) (Furie et al. 2011). Une étude a montré que la combinaison d'un IEC et d'un diurétique (périndopril + indapamide) permettait de réduire significativement de 43% le risque de récidive d'AVC contrairement à un traitement par périndopril seul (Group 2001). Les agents antihypertenseurs comme les β-bloquants, les IEC et les antagonistes de l'angiotensine 2 ont montré leurs bénéfices dans la prévention de l'AVC (Turnbull and Blood Pressure Lowering Treatment Trialists 2003) (Law, Morris, and Wald 2009).
- ✓ Le diabète est un facteur de risque d'AVC, les patients diabétiques connus ont presque 3 fois plus de risque de faire un AVC ischémique que les personnes qui ont une tolérance au glucose dans la normale basse. Ce risque persiste après ajustement sur les facteurs de risque comme l'âge, l'IMC, l'HTA, une hypertrophie ventriculaire gauche, le cholestérol, les triglycérides, le tabagisme, … avec un risque relatif supérieur à 2 chez les diabétiques connus (Burchfiel et al. 1994). L'étude UKPDS34 n'a pas montré de diminution significative du risque relatif de développer un AVC avec un traitement par metformine. Cependant, la metformine permet de diminuer le risque d'AVC par rapport à d'autres traitements antidiabétiques (chlorpropamide, glibenclamide ou insuline) ('Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group' 1998). La combinaison d'un dipeptidyl-peptidase 4 avec la metformine permet de diminuer le risque d'évènements cardiovasculaires majeurs, incluant l'IDM et l'AVC, par rapport à une combinaison sulfonylurée-metformine (Yu, Yin, and Azoulay 2015).
- ✓ Les patients sédentaires présentent un risque majoré de 28,5% de faire un AVC (ischémique ou hémorragique) par rapport aux patients qui pratiquent une activité physique régulière (O'Donnell et al. 2010). L'activité physique même légère (4 h de marche par semaine) permet de diminuer la sévérité de l'AVC (Reinholdsson,

Palstam, and Sunnerhagen 2018). Des niveaux modérés d'activité physique permettent de prévenir la survenue d'un AVC dans la population japonnaise (Kubota et al. 2017).

- ✓ Les facteurs psychosociaux comme le stress ou la dépression sont des facteurs de risque d'AVC (O'Donnell et al. 2010). Une enquête épidémiologique a démontré que les personnes âgées optimistes semblaient être protégées contre les AVC par rapport aux pessimistes. Le mécanisme semble être indirect puisque d'autres facteurs protecteurs entrent en jeux comme le fait que les personnes optimistes pratiquent plus d'activités physiques que les pessimistes (Ostir et al. 2001). Une étude récente vient de montrer que le sauna, qui permet de réduire le stress, pourrait réduire le risque d'AVC (Kunutsor et al. 2018).

4. Prise en charge aiguë de l'AVC ischémique

Le traitement d'urgence de l'AVC ischémique consiste, de la même manière qu'en cas d'IDM, en la revascularisation la plus précoce possible du territoire ischémié. En effet, le pronostic immédiat (vital) et postérieur (fonctionnel) dépend de la rapidité et de la qualité de la prise en charge du patient. Le cerveau est un organe qui nécessite un apport constant en oxygène et en glucose. Comme il n'y a pas de réserve en ces substrats, tout arrêt du flux cérébral est responsable d'une souffrance du tissu. En cas d'infarctus cérébral, il existe une zone de nécrose qui s'installe rapidement et une zone périphérique, nommée zone de pénombre, où les perturbations tissulaires sont réversibles si le débit sanguin est rétabli dans les heures qui suivent le début de l'ischémie (Figure 2).

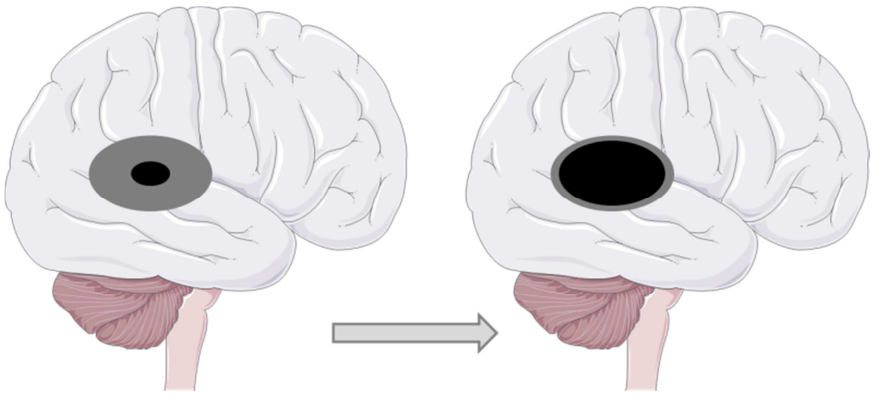


Figure 2 : Evolution de la zone d'ischémie cérébrale en l'absence de recanalisation : la zone de pénombre (en gris) est peu à peu remplacée par une zone de nécrose (en noir).

C'est cette zone qui constitue la cible des traitements d'urgence de l'AVC, pour ce faire il existe différentes techniques :

- ✓ La thrombectomie mécanique qui consiste à recanaliser l'artère cérébrale occluse à l'aide d'un dispositif de retrait du caillot introduit par voie endovasculaire. Cette technique permet de reperfuser les tissus en souffrance.
- ✓ La thrombolyse grâce au facteur tissulaire du plasminogène (t-PA) recombinant (altéplase).

La thrombectomie n'est possible que dans les centres spécialisés de neuroradiologie interventionnelle. La Haute Autorité de Santé a rendu un rapport qui montre un intérêt de la thrombectomie dans la prise en charge des patients ayant un AVC ischémique aigu, en rapport avec une occlusion d'une artère intracrânienne de gros calibre de la circulation antérieure, visible à l'imagerie dans un délai de 6 heures après le début des symptômes (Berkhemer et al. 2015). L'étude DAWN a même étendu ce délai à 24 heures après le début des symptômes, qui permet de diminuer l'invalidité à 90 jours post-AVC, ce qui a entrainé une modification des recommandations de la thrombectomie (Nogueira et al. 2018) (Powers et al. 2018). Une équipe a même publié un cas de traitement par thrombectomie à 90 heures post-AVC, pour lequel d'excellents résultats cliniques ont été présentés (Gunawardena et al. 2017). Cette technique peut être utilisée en association avec la thrombolyse ou en recours face à un échec à la thrombolyse ou une contre-indication à cette dernière. La thrombolyse, quant à elle, est bénéfique si elle est réalisée dans les 4h 30 après le début des symptômes (Emberson et al. 2014).

III. Incidences cardio-vasculaires de l'ischémie cérébrale d'un point de vue clinique

1. Etudes cliniques sur les conséquences cardiaques de l'AVC

De très nombreuses études cliniques ont montré que l'AVC entrainait des conséquences cardiovasculaires à plus ou moins long terme (Ripoll, Blackshear, and Diaz-Gomez 2018). Il a été récemment confirmé qu'un examen cardiaque était essentiel pour déterminer l'étiologie de l'AVC ischémique (Gnonlonfoun et al. 2018). Il a été décrit que les patients ayant subi un AVC avaient un risque élevé de mortalité cardiovasculaire et d'IDM (2,2% de risque annuel), ce qui conduit les cliniciens à prendre en charge de manière active la prévention secondaire dans cette population (Touze et al. 2005). Une méta-analyse plus récente indique que le risque annuel d'IDM après un AVC ou un accident ischémique transitoire (AIT) est de 1,67%. Ce risque annuel semble diminuer au fur et à mesure de l'évolution de la pathologie, et la récurrence d'AVC devient au bout de quelques temps une cause de mortalité plus fréquente que l'IDM (Boulanger et al. 2018). Kang et coll. ont également souligné, dans une population coréenne ayant fait un AVC ischémique, le fait que le risque de récidive d'AVC était plus important que celui d'IDM (Kang et al. 2016). Le travail d'Alqahtani et coll. expose le fait que 1,6% des patients qui présentent un AVC ischémique développent un IDM. Il existe des prédicteurs d'IDM après un AVC qui sont l'âge avancé, des antécédents de maladies coronariennes, une insuffisance rénale (IR) chronique, une FA ou des troubles de conduction. Les patients qui font un IDM suite à leur AVC ischémique ont un risque de mortalité intra-hospitalière multiplié par 3 et un séjour hospitalier qui est 50% plus long et plus cher qu'en l'absence de cette complication. L'évaluation invasive (angiographie coronaire) plus ou moins associée à un traitement (angioplastie, stent) améliore la survie chez ces patients mais malheureusement elle est réalisée dans moins de 10% des cas (Alqahtani et al. 2017). Plus de la moitié des patients qui font un AIT développent au moins une complication cardio-métabolique et 22% d'entre eux en font au moins deux. Sur une période de suivi de 5 ans, 27% des réadmissions étaient liées à des causes cardio-métaboliques qui représentaient 36% des décès constatés pendant cette période. Le taux de mortalité à 5 ans suite à un AIT est corrélé aux comorbidités cardio-métaboliques et au taux de réhospitalisation (Yousufuddin et al. 2018). Une étude a montré qu'un tiers des patients présentant un AVC ischémique et sans antécédents cardiovasculaires documentés avaient une sténose coronarienne et que 3% d'entre eux étaient à haut risque de développer un

IDM dans l'année (Gunnoo et al. 2016). Une autre équipe a mis en évidence que dans les 3 mois suivant un AVC ischémique, 4,1% des patients meurent de causes cardiaques et que 19% des patients présentent des évènements cardiaques sévères. Cette étude montre que l'origine cardiaque est la deuxième cause de décès après les causes neurologiques suite à un AVC ischémique (Prosser et al. 2007). Dans un travail publié par Micheli et coll., la mortalité 3 mois après un AVC était de 18,5% et la cause cardiologique concernait 17,8%. Durant l'hospitalisation de ces patients, 6,5% avaient développé des évènements cardiovasculaires dont l'IDM et l'insuffisance cardiaque (IC) aiguë. Ces évènements cardiovasculaires survenaient plus fréquemment chez les patients avec des antécédents d'IDM récents, chez ceux dont l'AVC était d'origine cardio-embolique et chez ceux qui avaient un score NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale) plus élevé à l'admission. Ainsi, chez les patients hospitalisés pour un AVC ischémique, les IDM et les IC aiguës sont fréquents et associés à un risque accru de mortalité à 3 mois (Micheli et al. 2012). D'une étude à l'autre, les taux de détection d'une FA sont très variables après un AVC ischémique ou un AIT, mais une méta-analyse indique un taux de 11,5% lorsque le monitoring s'effectue sur une période supérieure à 12 heures. Le prolongement du monitoring après 24 h permet d'augmenter le taux de détection de FA, qui, rappelons-le, est une complication fréquente de l'IDM et une cause majeure d'AVC (Kishore et al. 2014). Il est donc important de détecter cette pathologie, car la prise en charge thérapeutique du patient sera différente selon la présence ou non de FA. Une autre dysfonction myocardique observée après un AVC ischémique est le syndrome de Takotsubo. Cette complication est associée à un mauvais pronostic à court terme par rapport à ceux qui ne développent pas ce syndrome (Jung et al. 2016). La présence de troponines circulantes est un biomarqueur d'altération du tissu cardiaque, et il a été constaté que 13,7% des patients avec un AVC ischémique ont des troponines élevées (> 50 ng/L) alors que 50% d'entre eux n'ont aucun signe angiographique de lésions coronaires qui pourraient être à l'origine d'une ischémie myocardique (Mochmann et al. 2016). Une proportion différente a été trouvée dans l'étude réalisée par Ahn et coll. qui retrouvent uniquement 8,7% des patients présentant une élévation des troponines (> 40 ng/L) suite à leur AVC ischémique. Cette élévation des troponines est liée à des causes à la fois cardiologiques et neurologiques. En effet, des anomalies de l'électrocardiogramme (ECG) comme une prolongation de l'espace QT ou de la durée de l'onde Q, une élévation du segment ST ; une hypertrophie du VG, un score NIHSS élevé ou encore une lésion du cortex insulaire sont identifiés comme des prédicteurs d'élévation des troponines (Ahn et al. 2016). Enfin, il existe des cas particuliers, notamment un cas de cardiomyopathie induite par le stress suite à un AVC (Lee, Oh, and Koh

2016) et un cas d'IDM pendant le traitement d'un AVC ischémique par thrombolyse (Mannino et al. 2017). Le développement simultané d'un AVC et d'un IDM est peu commun, mais peut se retrouver dans 3 conditions particulières comme la présence de plaques instables concomitantes au niveau coronaire et carotidien ou un AVC ischémique dans le cas d'un IDM subaigu ou encore la survenue d'un IDM pendant le traitement salvateur de l'AVC par thrombolyse. Une étude a été réalisée chez des patients ayant subi un AVC pour déterminer l'influence du sexe et du diabète sur le développement des maladies coronariennes. Ainsi, les femmes diabétiques, en plus de faire leur AVC plus tôt que les hommes, présentent plus de pathologies coronariennes que les femmes non diabétiques. Ceci suggère un impact du sexe sur l'association entre diabète et maladies vasculaires. Ces résultats incitent donc à une prise en charge plus intense des facteurs de risque chez les femmes diabétiques (Madsen et al. 2018). Enfin, une étude vient de démontrer que, dans la population japonaise ayant fait un premier AVC ischémique ou un AIT, la proportion de patients ayant des antécédents de coronaropathies symptomatiques était très faible (1,1%). Cependant, la scintigraphie myocardique permettait d'identifier des maladies coronariennes asymptomatiques chez ¼ des patients dans cette population et lorsque cet examen s'avérait positif, il était associé à un risque accru d'évènements cardiovasculaires ultérieurs (Tagawa et al. 2019).

2. Relations entre les localisations de l'AVC et son impact sur le système cardiovasculaire

Plusieurs études indiquent qu'en fonction de l'hémisphère cérébral impliqué dans l'AVC, les conséquences sur le système cardio-vasculaire seront différentes, c'est ce qu'on appelle le phénomène de latéralisation. Le cortex insulaire (Figure3) est un site fréquent de lésions d'AVC, puisqu'il serait impliqué dans environ 65% des cas, avec une localisation équivalente à droite et à gauche. Cependant, lorsque les dommages cérébraux affectent le cortex insulaire droit, les conséquences sur la fonction cardiaque sont plus importantes que lorsqu'ils touchent le cortex insulaire gauche, avec notamment des arythmies plus complexes (Colivicchi et al. 2004). A l'inverse, une autre étude indique que ces patients qui font un AVC ischémique avec implication du cortex insulaire gauche présentent un risque de conséquences cardiovasculaires sévères plus important. L'AVC insulaire gauche semble dans ce travail être un prédicteur indépendant de conséquences cardiaques graves telles que le décès d'origine cardiaque, un IDM, un angor ou une IC (Laowattana et al. 2006). L'implication du cortex insulaire semble avoir un impact plus important que d'autres zones cérébrales sur la mortalité post-AVC, en particulier lorsque les lésions touchent le cortex insulaire droit (Sposato et al.

2016). Une étude a tenté d'associer certaines zones cérébrales ischémiées à l'augmentation des troponines. Les troponines étaient augmentées pour 6,7% des patients et les zones cérébrales correspondantes étaient le cortex insulaire droit : postérieur, supérieur et médian, ainsi que le lobule inférieur pariétal droit (Ay et al. 2006). Une autre étude a montré que, sur un second prélèvement sanguin postérieur à celui effectué à l'admission des patients, et lorsque la technique d'analyse permettait de détecter des concentrations faibles de troponines, 66% des patients présentant un AVC avaient une élévation de troponines ultra-sensibles. Cette augmentation de troponine était associée à des lésions cérébrales à droite et notamment au niveau du cortex insulaire (Krause et al. 2017). Les complications cardiovasculaires de l'AVC ischémique, comme le syndrome de Takotsubo, sont plus fréquentes lorsque l'AVC touche le cortex insulaire et les aires insulaires périphériques, incluant le cortex préfrontal ou le subcortex et en particulier le cortex insulaire droit (Jung et al. 2016).

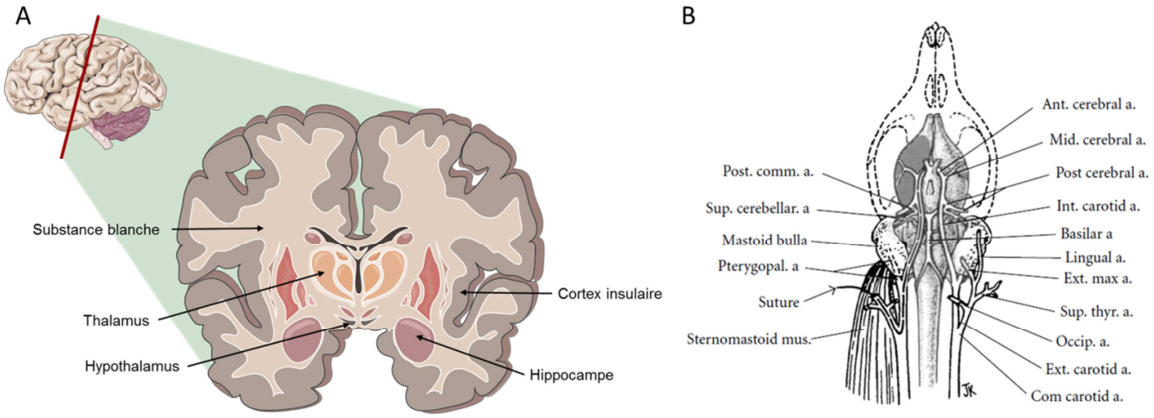


Figure 3 : Schéma anatomique du cerveau humain (A) et du cerveau de rat (B)

3. Biomarqueurs potentiels dans l'AVC

Si le domaine des maladies cardiovasculaires se caractérise par une recherche dynamique et fructueuse en terme de biomarqueurs, qui a abouti à l'utilisation en routine de plusieurs d'entre-eux dans un cadre diagnostique ou pronostique (troponines, N-terminal-pro-Brain Natriuretic Peptide (NT-proBNP), …), le contexte de l'AVC repose plus sur une analyse clinique de la symptomatologie que sur l'utilisation de biomarqueurs circulants. Dans ce cadre, le Dickkopf-1 (Dkk-1) est un antagoniste de la famille de glycoprotéines Wingless-Int (Wnt) qui est impliquée dans le développement embryonnaire et dans de nombreuses pathologies. Le Dkk-1 jouerait un rôle dans l'activation endothéliale médiée par les plaquettes chez les patients coronariens et serait augmenté dans les neurones d'animaux soumis à une ischémie cérébrale ou une maladie neurodégénérative. Les niveaux plasmatiques de Dkk-1 sont augmentés de manière significative chez les patients avec un AVC ischémique comparés aux patients avec une maladie cérébrale stable ou aux patients sains. Actuellement, le Dkk-1

n'est néanmoins pas un marqueur pronostique d'AVC ischémique (Seifert-Held et al. 2011). La protéine S100B qui lie le calcium est principalement concentrée dans les astrocytes. Ses niveaux dans les liquides biologiques (liquide céphalo-rachidien, sang, urine, salive, …) sont reconnus comme un révélateur de détresse neuronale. Cette protéine peut ainsi être considérée comme un biomarqueur diagnostic d'AVC ischémique (Monbailliu, Goossens, and Hachimi-Idrissi 2017). En outre, une délétion ou une inactivation de cette protéine induit une amélioration de pathologies neuronales, avec par exemple une diminution de l'expression de gènes pro-inflammatoires comme le tumor necrosis factor α (TNFα) (Michetti et al. 2019). Une équipe chinoise a montré qu'un traitement par S100B aggravait l'ischémie cérébrale chez la souris après une MCAO gauche (Zhou et al. 2018). Une équipe a étudié un panel de protéines qui sont associées au développement d'un AVC, et a mis en évidence 3 marqueurs de risque qui sont 1/ le NT-proBNP, un peptide sécrété par le ventricule cardiaque en réponse à un stress, 2/ la protéine cationique éosinophile, protéine libérée par les cellules éosinophiles activées et 3/ l'adrénomédulline, une hormone responsable de vasodilatation mais aussi d'angiogénèse ou d'une protection envers le stress oxydant (Lind et al. 2015). L'équipe de Suleiman a montré que les troponines cardiaques et la créatine kinase MB étaient présentes à des taux sériques plus élevés chez les patients avec un AVC ischémique que chez les patients contrôles. De plus, les troponines cardiaques augmentaient avec la sévérité de l'AVC évaluée grâce au score NIHSS, ce qui n'était pas le cas pour la créatine kinase MB. Les troponines cardiaques évaluées durant la phase aiguë de l'AVC sembleraient ainsi constituer un marqueur de sévérité de l'AVC ischémique (Suleiman et al. 2017). Une étude récente montre que l'augmentation des troponines cardiaques est similaire entre un groupe de patients avec un IDM associé à un AVC ischémique et un groupe avec un IDM seul. Les taux élevés de troponines cardiaques étaient plus susceptibles d'être dus à une cause cardiaque qu'à une origine cérébrale. Les troponines cardiaques sont plus élevées quand la lésion cérébrale touche la circulation antérieure versus postérieure (Yildiz et al. 2018). D'autre part, les taux de phospholipides oxydés élevés seraient prédicteurs de récurrence d'AVC et d'évènements cardiovasculaires majeurs et seraient des biomarqueurs indépendants de prévention secondaire d'évènements cérébro-vasculaires (Byun et al. 2017). Une étude chinoise a récemment démontré que le phénotype de patients présentant une hypertriglycéridémie associé à un tour de taille élevé était accompagné d'une augmentation du risque d'AVC ischémique. Ceci laisse penser qu'il pourrait être un outil simple de screening des patients à haut risque d'AVC ischémique. Dans cette catégorie de patients, les femmes, les fumeurs, les patients avec une glycémie normale et ceux traités avec des antihypertenseurs semblaient être plus à risque de

développer un AVC ischémique (Wang et al. 2018). Enfin, une autre étude indique qu'un génotype d'expression forte du transporteur de sérotonine SERT est associé à un risque moindre d'AVC ischémique ou d'AIT. Avec l'explosion actuelle du diagnostic génotypique, cette information pourrait donner des perspectives d'évaluation du risque d'AVC ischémique dans des populations spécifiques à risque (Mortensen et al. 2018).

4. Mécanismes potentiellement impliqués dans les conséquences cardiaques de l'AVC

Dans un travail où 20% des patients présentant un AVC ischémique voyaient leurs troponines augmentées (> 0,2 µg/L) et dans lequel presque 25% des patients présentaient une lésion impliquant le cortex insulaire droit ou gauche, une augmentation significative des taux sériques d'adrénaline (Ad) était par ailleurs constatée. L'augmentation des troponines était corrélée à plusieurs paramètres, et notamment à l'augmentation des taux d'Ad. Les patients ayant des troponines élevées avaient des modifications de leur ECG et étaient plus susceptibles de faire un IDM. L'augmentation des troponines en relation avec l'élévation d'Ad semble évoquer une activation du système nerveux sympathique qui conduirait à des altérations myocardiques (Barber et al. 2007). L'équipe de Csecsei a exposé le fait que les patients dont le score NIHSS s'aggravait au cours de l'hospitalisation avaient des taux sériques de monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) et de troponines plus élevés que les patients dont le score NIHSS s'améliorait. Les taux de troponines, de S100B et de protéine C réactive (CRP) hypersensible étaient augmentés chez les patients qui décédaient. Des taux élevés de troponines étaient associés à des taux élevés de marqueurs de thrombo-inflammation comme MCP-1 et le t-PA. Des taux élevés de troponines à 24 h semblent prédicteurs d'une aggravation du score NIHSS mais pas de la mortalité (Csecsei et al. 2018). L'augmentation des troponines sériques, la FA, des modifications de l'ECG et la présence d'une dysfonction systolique sont associés à des AVC plus sévères et à un taux de mortalité intra-hospitalier plus élevé. Ces données confirment bien la nécessité de réaliser un monitoring cardiaque chez les patients admis pour un AVC ischémique (Wira, Rivers, Martinez-Capolino, et al. 2011).

Une autre étude a montré que les patients ayant subi un AVC ischémique avaient des taux sériques de Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) plus élevés que chez les patients contrôles. Les patients dont l'AVC touchait les gros vaisseaux avaient des taux de GDF15 supérieurs à ceux dont l'AVC touchait des petites artères. Une analyse génotypique a été entreprise sur les types de variants du gène du GDF15 chez ces patients, et ceux dont le

génotype de rs1804826G/T était TT ou GT avaient des taux sériques plus élevés que les patients à génotype GG. Cette différence n'était pas observée chez les contrôles et il n'existait pas de différence, non plus, sur les autres génotypes du gène du GDF15. Le niveau d'expression du GDF15 semble donc jouer un rôle dans le développement de l'AVC ischémique (Xiang et al. 2017). Une étude génétique a démontré une association entre le polymorphisme mononucléique rs9534725 et le risque de maladie coronarienne et d'AVC ischémique. Les patients avec un génotype GG et l'allèle G étaient associés à une augmentation du risque de maladies coronariennes et d'AVC ischémiques quand ces patients avaient un IMC important et étaient tabagiques (Miao et al. 2017). Trois autres polymorphismes mononucléiques ont été identifiés comme significativement associés à la prévalence d'AVC ischémique, il s'agit de rs6580741, de rs1324015 et de rs884205. La prévalence d'AVC ischémique était réduite chez les sujets porteurs des allèles mineurs par rapport à ceux porteurs des allèles majeurs. Ceci laisse penser que les génotypes CC de rs6580741, AA de rs6580741 et TT de rs884205 sont protecteurs vis-à-vis de l'AVC ischémique (Yasukochi et al. 2018). Chez des patients diabétiques ayant subi un AVC ou un AIT, il a été démontré que les patients qui sont dans le dernier quartile de l'index J, qui correspond à une mesure de la qualité du contrôle glycémique, avaient une mortalité cardiovasculaire accrue. Cette étude montre que des variations glycémiques dans les 3 premiers jours post-AVC ou AIT sont associées à la survenue d'évènements cardiovasculaires à 3 mois (Yoon et al. 2017).

5. Traitements envisageables afin de réduire l'impact cardio-vasculaire de l'AVC

Un travail assez ancien a montré que l'administration d'aténolol 20 heures après un traumatisme crânien (10 mg toutes les 6 heures en intraveineuse pendant 3 jours puis 100 mg par voie orale pendant 4 jours) permettait de réduire l'augmentation de créatine kinase MB et de diminuer les tachycardies supra-ventriculaires. Cependant, ce traitement n'avait pas d'effet sur les taux de noradrénaline (NA) circulante ni sur la mortalité intra-hospitalière. L'aténolol permettait néanmoins de diminuer l'étendue de la nécrose cardiaque de stress qui accompagnait le traumatisme crânien (Cruickshank et al. 1987). Il a également été souligné le fait que les patients sous β-bloquants à l'admission avaient des AVC moins sévères, une diminution du tonus sympatho-vagal, des taux de thrombine, d'hémoglobine glycquée, et une réduction de la vitesse de sédimentation érythrocytaire. Les β-bloquants pourraient donc exercer des effets cérébro-protecteurs dans l'AVC ischémique (Laowattana and Oppenheimer

2007). Un traitement préalable par β-bloquant permettrait aussi de diminuer l'incidence des vasospasmes cérébraux suite à une hémorragie sous arachnoïdienne. En effet, c'est une complication classique qui a un impact significatif sur le pronostic du patient (Chalouhi et al. 2016). Plus de 70% des patients qui se présentent avec un AVC ischémique ou hémorragique sont hypertendus. Une étude a porté sur l'efficacité d'un patch transdermique de trinitrine (5 mg/j), composé donneur de monoxyde d'azote (NO) aux effets vasodilatateurs, neuro-protecteurs et inhibiteurs de l'apoptose. Malheureusement, le traitement par le patch, s'il permettait de diminuer la pression artérielle, n'améliorerait pas le pronostic des patients à 3 mois. Il n'y avait pas d'intérêt non plus à réintroduire le traitement antihypertenseur chez les patients dans les jours qui suivaient l'AVC (Investigators et al. 2015). Une autre classe thérapeutique a été testée chez des patients avec un AVC ischémique ou hémorragique associé à une HTA, il s'agit du candésartan. La dose était augmentée progressivement de 4 mg à 16 mg pendant les 3 premiers jours et le traitement était pris sur une semaine. Néanmoins, il n'a pas été démontré d'effet bénéfique du candésartan sur les évènements vasculaires au cours de la phase aiguë de l'AVC. Cependant, un effet positif était observé si le traitement était initié dans les 6 heures suivant le début de l'AVC, mais uniquement pour les AVC ischémiques (Jusufovic et al. 2016). Une étude a montré que, chez des patients qui ont fait un AVC ou un AIT et qui ont une résistance à l'insuline sans être diabétiques, un traitement par pioglitazone (de 15 mg/j au début jusqu'à une dose cible de 45 mg/j) permettait de diminuer le risque d'IDM par rapport à un placebo. La pioglitazone permettait de diminuer l'incidence des IDM de type 1, spontanés, mais pas des IDM de type 2, secondaires et dus à un déséquilibre en oxygène. Le traitement diminuait le risque d'IDM quand celui-ci était accompagné d'une augmentation : du segment ST, des taux de troponines supérieurs à 100 fois la normale, mais cet effet n'était pas observé quand l'IDM était moins sévère (Young et al. 2017). Une autre étude chez la même catégorie de patients a confirmé le bénéfice d'un traitement par la pioglitazone chez les patients à haut risque avec une diminution de la survenue d'un IDM ou d'une récidive d'AVC. L'avantage du traitement était néanmoins contrebalancé par une augmentation du risque de fractures (Kernan et al. 2017). L'équipe de Park a travaillé sur des patients avec des AVC ischémiques mineurs ou des AIT à haut risque. Il a été démontré qu'en Corée, dans cette population, les évènements suivant l'accident étaient moins importants que dans des études précédentes aux USA ou au Royaume Uni. Un traitement antithrombotique, majoritairement à base d'aspirine, était instauré chez la quasi-totalité des patients et plus d'un tiers des patients avait une polythérapie antiplaquettaire. A la sortie, la constatation était la même, avec plus de 95% des patients avec un traitement antithrombotique, principalement de

l'aspirine et du clopidogrel. Il semble donc essentiel de mettre en place un traitement optimal à base d'antithombotique suite à un AVC mineur ou un AIT à haut-risque (Park et al. 2017). Les dommages nitro-oxydatifs liés à l'ischémie-reperfusion cérébrale peuvent constituer un frein aux bénéfices de la revascularisation de l'AVC ischémique. Les principales complications post-revascularisation sont les transformations hémorragiques et les œdèmes cérébraux. Plusieurs thérapies à visée neuroprotectrice limitant les lésions de reperfusion ont été envisagées, soit non pharmacologiques comme le conditionnement ischémique à distance ou l'hypothermie thérapeutique, soit pharmacologiques avec différentes molécules comme l'edavarone, un antioxydant pharmacologique, l'acide urique, antioxydant endogène ou la citicoline qui joue un rôle dans la constitution de la membrane (Sun, Jin, et al. 2018). L'étude de Byun a montré que les taux de phospholipides oxydés n'étaient pas impactés par un traitement avec une statine. Comme les phospholipides oxydés sont des prédicteurs de récurrence d'AVC et d'évènements cardiovasculaires majeurs, ils pourraient constituer des cibles thérapeutiques pour réduire le risque cardiovasculaire après un AVC (Byun et al. 2017). Une étude est en cours pour déterminer si la mise en place d'un programme de prévention secondaire suite à l'AVC permettrait de prévenir les accidents cardiovasculaires et notamment l'IDM. Plusieurs études ont démontré que la prévention secondaire suite à un AVC (ischémique ou hémorragique) ou un AIT conduisait à une baisse de la pression artérielle, une diminution du cholestérol, une meilleure adhérence aux traitements par statines et à la mise en place d'une activité physique (Toell et al. 2018).

IV. Incidences cardio-vasculaires de l'ischémie cérébrale d'un point de vue expérimental

L'ensemble des travaux cliniques précédemment présentés démontrent avec clarté que l'AVC, ischémique ou hémorragique, induit des conséquences délétères sur la fonction cardiovasculaire du patient. Ce concept est renforcé par des études expérimentales, réalisées chez le rat ou la souris, et dont l'objectif a été d'en étudier plus précisément les facteurs favorisant, les relations avec certaines zones cérébrales, les mécanismes potentiels, ainsi que d'envisager des pistes thérapeutiques de traitement.

1. Facteurs influençant la réponse cardiovasculaires à l'ischémie cérébrale

Si chez l'Homme, comme nous l'avons vu précédemment, l'HTA est un important facteur de risque d'AVC, des rats spontanément hypertendus (SHR) ne réagissent pas de la même manière à un AVC induit par une occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) droite que des rats normotendus. Il a été montré que, 6 heures après une MCAO, les rats SHR présentaient une diminution de la pression artérielle, de la décharge sympathique du nerf rénal et de l'Ad plasmatique qui n'étaient pas retrouvées chez les rats normotendus, avec même un effet inverse. Il existe donc des différences dans la réponse à une ischémie cérébrale qui pourraient être liées à des variations génétiques du système nerveux autonome (SNA) (Butcher et al. 1993). Il a également été montré que l'HTA pouvait être un facteur pathogénique de développement de lésions myocardiques suite à un AVC. Chez le rat SHR, l'occlusion bilatérale des artères carotides entraine une augmentation de la fréquence cardiaque (FC), de l'activité d'enzymes plasmatiques comme la lactate déshydrogénase et la créatine phosphokinase ainsi que des arythmies et des signes histologiques de nécrose et de fibrose (Kakihana, Shino, and Nagaoka 1983). En outre, des rats d'âge mature sont plus sensibles à une MCAO gauche que des rats plus jeunes, et développent des niveaux plus élevés d'activité sympathique et des allongements de l'intervalle QT à l'ECG. L'âge du rat semble donc altérer la régulation sympathique et contribuer à une augmentation de la mortalité après AVC ischémique (Hachinski, Wilson, et al. 1992). Néanmoins, l'impact de l'AVC sur la fonction cardiaque semble être un effet indépendant de l'âge. En effet, chez des rats de 6-8 semaines (jeunes) ou des rats de 12 mois (âgés), une MCAO induit une diminution

semblable de la fraction d'éjection ventriculaire gauche et une augmentation similaire de la FC (Bieber et al. 2017).

Si les travaux précédemment cités montrent que des lésions ischémiques du cerveau ont des conséquences au niveau cardiaque, des atteintes hémorragiques de l'encéphale sont également susceptibles d'affecter la fonction du myocarde. Ainsi, une injection stéréotaxique de collagénase dans le striatum droit de rats est suivie par un raccourcissement des cardiomyocytes et un ralentissement des flux calciques 12 et 24 heures après l'hémorragie. Ces évènements sont accompagnés d'une augmentation du stress nitro-oxydant cardiaque (Fang, Wu, and Ren 2006).

2. Influence de la localisation de l'infarctus cérébral sur l'impact cardiovasculaire de l'AVC

Le phénomène de latéralisation de l'AVC, que nous avons évoqué précédemment, s'observe aussi sur des modèles expérimentaux. Plusieurs études ont mis en évidence des conséquences différentes en fonction de l'hémisphère impacté. L'équipe d'Hachinski a exposé le fait qu'une MCAO droite chez le rat entrainait plus de conséquences qu'une MCAO gauche, avec une élévation plus importante de pression artérielle, une augmentation pérenne de la décharge sympathique du nerf rénal, une augmentation de la noradrénaline circulante et un allongement de l'intervalle QT à l'ECG (Hachinski, Oppenheimer, et al. 1992). De même, 2 heures après une MCAO droite, il y avait beaucoup plus d'arythmies, de type de fibrillation et tachycardie ventriculaires, associées à un allongement de la durée du potentiel d'action et de l'intervalle QT (Sun et al. 2008). L'étude de Bieber et coll. a montré que seule une MCAO droite avait des conséquences sur la fraction d'éjection ventriculaire gauche, la FC, la pression diastolique, la contraction et la relaxation ventriculaire (Bieber et al. 2017). A l'inverse, dans un travail réalisé par une autre équipe mais chez la souris cette fois, seulement les MCAO gauches conduisaient à des dysfonctions cardiaques avec diminution de la pression systolique ventriculaire gauche, de la contraction et de la relaxation ventriculaires (Min et al. 2009). On peut donc considérer qu'il existe une latéralisation des effets cardiaques de l'ischémie cérébrale chez le rongeur comme chez l'Homme, mais que des différences sont présentes en fonction des espèces, et que chez le rat, les AVC ischémiques du côté droit s'accompagnent de conséquences cardiaques plus importantes.

La localisation cérébrale de l'AVC est aussi un point critique. Le cortex insulaire est une zone cérébrale connue pour être impliquée dans la régulation du tonus sympatho-

vagal, ce qui est d'une importance majeure pour déterminer les conséquences cardiaques d'une ischémie cérébrale. Ainsi, une stimulation directe du cortex insulaire conduit à des modifications de l'ECG, des arythmies cardiaques et des dommages tissulaires cardiaques à type de myocytolyse (Oppenheimer et al. 1991) (Oppenheimer and Cechetto 2016). Le fait de provoquer des lésions du cortex insulaire avec une excito-toxine conduit aussi à des modifications de la pression artérielle et de la FC mais n'entraine pas d'altérations myocardiques (Butcher and Cechetto 1995). Lorsque la zone ischémique cérébrale englobe le cortex insulaire, les arythmies sont plus fréquentes que lorsque le cortex insulaire n'est pas impliqué (Sun et al. 2008). Il a été montré que le cortex insulaire gauche est impliqué dans l'intégration de l'activité parasympathique alors que le cortex insulaire postérieur droit est impliqué dans la régulation sympathique (Sturm et al. 2018) (Oppenheimer et al. 1992).

3. Notion de protection par le pré-conditionnement

Le pré-conditionnement ischémique est un phénomène de mise en œuvre de protections endogènes, par lesquelles de courtes périodes d'ischémie, réalisées préalablement à une ischémie de longue durée, sont capables de réduire les lésions ischémiques et la taille de l'infarctus du tissu ou de l'organe considéré. Le pré-conditionnement ischémique a été initialement décrit au niveau du cœur, et il s'est par la suite étendu à différentes techniques, qu'elles soient ischémiques, mécaniques ou pharmacologiques avec le nicorandil (Group 2002) ou la ciclosporine A (Weinbrenner et al. 1998). Il faut souligner que le préconditionnement ischémique est celui qui apporte le plus de bénéfices cliniques alors que le préconditionnement pharmacologique s'avère parfois infructueux, notamment chez l'Homme. Chez l'Homme, le préconditionnement ischémique repose sur des techniques comme l'occlusion coronaire par le ballon d'angioplastie, ou l'occlusion artérielle d'un membre supérieur ou inférieur avec une manchette afin de réaliser un pré-conditionnement à distance (voir plus loin) (Murry, Jennings, and Reimer 1986) (Przyklenk et al. 1993) (Schmidt et al. 2007) (Hausenloy and Yellon 2008). Les mécanismes cellulaires du préconditionnement ont été très étudiés, et 2 grandes voies de signalisation de cardioprotection ou de survie ont été identifiées. Il s'agit de la voie reperfusion injury salvage kinase (RISK), décrite la première (Schulman, Latchman, and Yellon 2002), et la voie survivor activating factor enhancement (SAFE), décrite postérieurement (Lecour 2009) (Figure 4). La voie RISK fait intervenir de nombreux acteurs comme la phosphatidylinositol-3-kinase, la protéine kinase B (Akt), la « mechanistic target of rapamycine » ou les « extracellular signal-regulated kinase 1/2 » qui vont conduire, en effecteur final, à la fermeture du pore de transition mitochondrial et ainsi à

la survie cellulaire. La voie SAFE fait quant à elle concourir plusieurs acteurs comme la janus kinase 2 (JAK2) et le signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) suite à l'activation du récepteur du TNFα. Cette seconde voie va conduire à l'augmentation d'expression de protéines anti-apoptotiques et à la diminution de protéines pro-apoptotiques (Rosenberg et al. 2018).

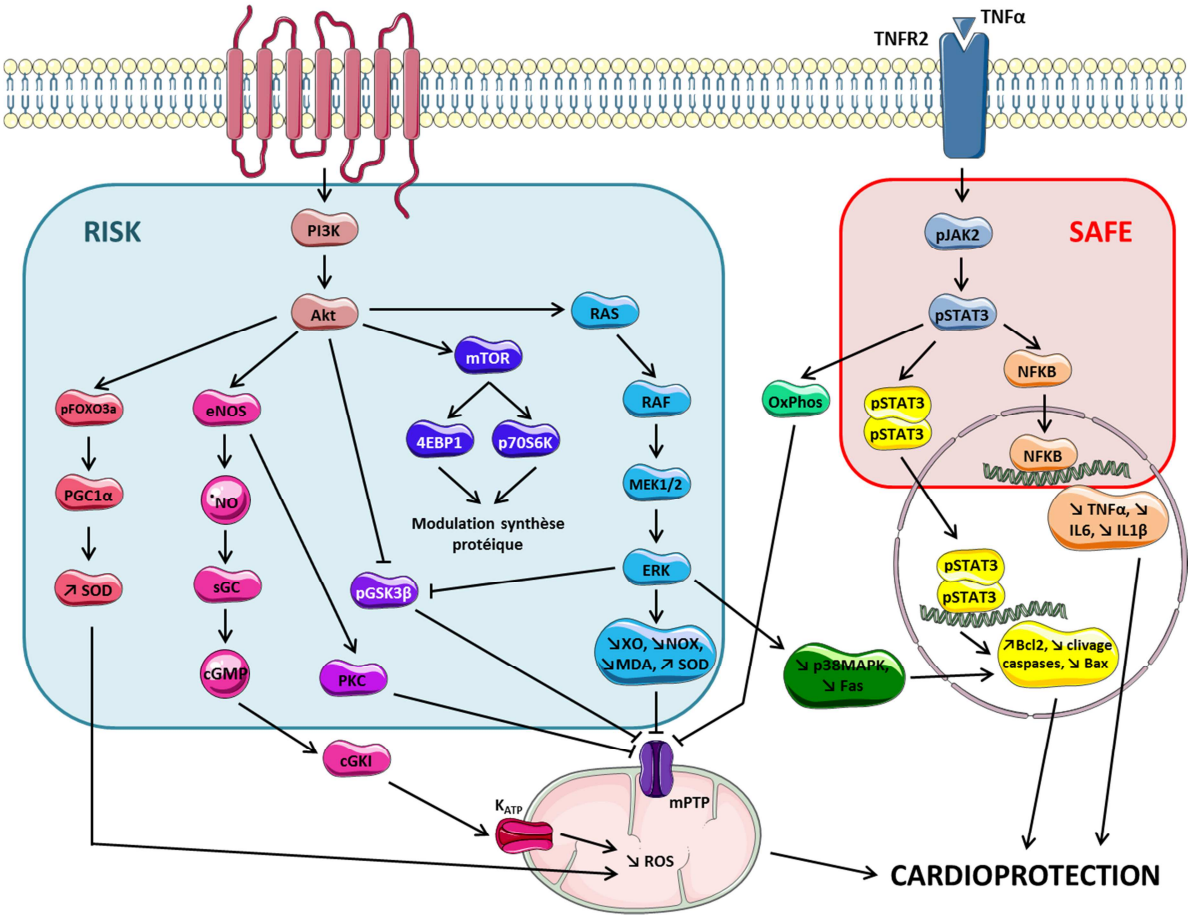


Figure 4 : Voies de cardioprotection RISK et SAFE d'après Intachai et coll. (Intachai et al. 2018). 4E-BP1 : deux substrats canoniques de mTORC1, Akt : protéine kinase B, Bax : protéine Bcl2-associée à X, Bcl2 : cellules B de lymphome 2, cGMP : guanosine monophosphate cyclique, cGKI : protéine kinase de type I dépendante du cGMP, ERK : extracellular signal-regulated kinase, Fas : superfamille 6 des récepteurs au TNF, IL-6 : interleukine 6, IL-1β : interleukine 1β, JAK2 : Janus kinase 2, K_{ATP} : Canal potassique, MDA : malondialdehyde, MEK : protéine kinase activée par le mitogen/signal régulé extracellulaire kinase kinase, mPTP : pore de perméabilité mitochondrial, mTOR : cible mécanistique de la rapamycine, NF-κB : facteur nucléaire kappa B, NO : monoxyde d'azote, eNOS : NO synthase endothéliale, NOX : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxydase, OxPhos : Phosphorylation oxydative, p70S6K : ribosomal protein S6 kinase beta-1 de 70-kDA, pFOXO3a : phosphorylated forkhead box subfamily O3a, PGC1α : peroxisome proliferator-activated, pGSK-3β : phospho glycogen synthase kinase 3β, PI3K : phosphoinositide 3-kinase, PKC : protéine kinase C, p38MAPK : p38 mitogen-activated protein kinases, Ras : Serine kinase, Raf : threonine kinase, RISK: reperfusion injury savage kinase, ROS : Espèces réactives de l'oxygène, SAFE: survivor activating factor enhancement, SOD : superoxyde dismutase, sGC : guanylyl cyclase soluble, STAT3 : signal transducers and activators of transcription 3, TNFα : facteur de nécrose tumoral α, TNFR2 : Récepteur 2 au TNF, XO : Xanthine oxydase.

Le concept de préconditionnement ischémique s'est par la suite étendu au post-conditionnement, puis au conditionnement à distance, phénomène par lequel une ischémie réalisée sur un organe à distance du cœur, le plus souvent un membre supérieur ou inférieur, est capable d'exercer des effets protecteurs vis-à-vis de l'ischémie du myocarde. L'extension

de ce principe à l'AVC pourrait laisser penser que l'ischémie cérébrale protégerait le cœur, mais la réalité est toute autre, car il a été montré qu'une ischémie cérébrale transitoire de 10 ou 30 minutes n'induisait pas de préconditionnement cardiaque à distance chez le cochon (de Zeeuw et al. 2001).

4. Voies de signalisation potentiellement impliquées dans les conséquences cardiaques de l'ischémie cérébrale

De nombreuses voies de signalisation ont été étudiées pour essayer de mieux comprendre le mécanisme biologique de ces interactions délétères cerveau-cœur. Ainsi, les lésions cérébrales ischémiques semblent avoir un effet direct et de longue durée sur les cardiomyocytes. En effet, il a été démontré que suite à une MCAO ou un AVC hémorragique chez le rat, des modifications des flux sodiques, potassiques et calciques se produisent au niveau des cardiomyocytes isolés des cœurs de ces animaux. Suite à une hémorragie intracérébrale, des perturbations des différentes protéines impliquées dans la régulation de l'hométostasie calcique étaient observées dans les heures et jours suivants. Notamment, une augmentation d'expression protéique de la Ca^{2+}-ATPase du réticulum sarco-endoplasmique (SERCA2a) et du phospholamban (PLB) associées à une diminution d'expression protéique de l'échangeur Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) et du canal potassique voltage dépendant (Fang, Wu, and Ren 2006). Deux heures après une MCAO, l'expression génique et protéique d'une sous-unité du canal calcique, Cav 1.2, était significativement augmentée dans le cœur des animaux qui faisaient des arythmies (Sun et al. 2008). Cette augmentation d'expression de Cav 1.2 au niveau cardiaque était également retrouvée 24 heures après une MCAO, et était accompagnée d'une diminution d'expression génique et protéique d'une sous-unité du canal sodique (Nav1.5) et de 2 sous-unités du canal potassique (Kv4.2 et Kv4.3) (Wang et al. 2009). Ces résultats concernant les acteurs de l'homéostasie calcique ont été confirmés dans une autre étude, 2 heures et 24 heures après MCAO. L'expression du récepteur à la ryanodine n'était pas modifiée par la MCAO, par contre, celles de SERCA2a et du NCX étaient diminuées dès 2 heures post-MCAO, contrairement à celle du PLB qui était augmenté uniquement durant la phase aiguë suivant la MCAO (Sun et al. 2010).

L'implication du stress nitro-oxydant a été évoquée dans différentes études. Fang et son équipe ont montré qu'une hémorragie intracérébrale entrainait une augmentation précoce des taux de 3-nitrotyrosine ainsi que de l'expression de la NO synthase inductible dans le cœur, ce qui suggère une possible implication des dommages nitro-oxydatifs dans la dysfonction cardiaque (Fang, Wu, and Ren 2006). La MCAO diminuerait aussi les taux

cardiaques de superoxyde dismutase (antioxydant) et augmentait ceux de malondialdéhyde (marqueur de stress oxydant) (Wang, Liu, et al. 2014). Une augmentation de l'expression protéique de la NADPH oxydase 2 a été observée dans les cœurs de souris, 28 jours après MCAO distale (Chen et al. 2017). Une diminution des défenses anti-oxydantes totales a été notée 3 heures après MCAO chez des rats (Kumas et al. 2017). Une augmentation des marqueurs de stress du RE a été démontrée dans le foie de rats ayant subi un AVC 24 heures auparavant (Wang, Lin, et al. 2014).

D'autres voies de signalisation ont été étudiées pour expliquer les conséquences cardiaques de l'ischémie cérébrale. Il a été suggéré que certains « messages de mort cellulaire » pourraient être envoyés par les neurones ischémiés en direction du cœur, ces substances exerceraient des effets toxiques délétères sur les cardiomyocytes. Les signaux impliqués étaient des cytokines de nécrose (TNFα), d'apoptose (Caspase 3, Fas Ligand) et d'autophagie (MAP1L3CA) qui contribuaient à une diminution de la viabilité cellulaire des cardiomyocytes (Ishikawa et al. 2013). Ainsi, il a été par la suite montré que des signaux d'apoptose (Bax/Bcl2) étaient augmentés après la MCAO que ce soit au niveau cardiaque ou au niveau de l'hippocampe (Kumas et al. 2017) (Zhang, Zheng, et al. 2017). Plusieurs études rapportent également une augmentation de l'activation des voies de l'inflammation après un l'AVC. Cette inflammation concerne bien entendu principalement le cerveau (Zhang, Zheng, et al. 2017), mais elle peut s'étendre à d'autres organes à distance comme le cœur. Il a, par exemple, été montré chez la souris, que la MCAO entrainait une augmentation significative de l'infiltration de macrophages et de l'expression de TGFβ cardiaque 28 jours après l'induction de l'AVC (Chen et al. 2017).

Le SNA sympathique est l'élément le plus étudié, et qui semble jouer une importance majeure dans les interactions cerveau-cœur après l'AVC. Dès 1989, Cechetto et son équipe ont montré une augmentation significative des catécholamines plasmatiques, Ad et NA, 90 et 180 minutes après une MCAO gauche (Cechetto et al. 1989). Cette augmentation des catécholamines plasmatiques peut avoir une cinétique différente en fonction de l'âge des animaux ; ainsi, les taux de NA s'élèvent dès 4 h chez les rats âgés alors qu'il faut attendre 6 heures chez des rats plus jeunes (Hachinski, Wilson, et al. 1992). Cette activation du SNA sympathique semble à la fois être initiée très rapidement, avec une augmentation des taux de NA observée dès 1 heure post-MCAO, mais aussi persister au long terme puisque cette activation est encore présente 2 à 10 jours après la MCAO (Hachinski, Oppenheimer, et al. 1992) (Cheung, Hachinski, and Cechetto 1997). Une autre étude a même montré que cette

activation sympathique était toujours présente 8 semaines après la chirurgie, avec une augmentation non seulement des taux de NA, d'Ad mais aussi de ceux du cortisol (Bieber et al. 2017). Le fonds génétique du rat impacte la réponse du système nerveux sympathique, car les taux d'Ad sont moins augmentés 6 heures après MCAO chez les rats SHR que chez des rats Wistar (Butcher et al. 1993). La stimulation d'une aire cérébrale spécifique, comme le cortex insulaire, entraine aussi une augmentation de NA 8 heures après le début de l'expérience (Oppenheimer et al. 1991). Ces taux de NA élevés sont aussi associés à une augmentation des taux tissulaires cardiaques de NA 24 heures après une MCAO gauche, lorsqu'une dysfonction cardiaque est observée (Min et al. 2009). Les hormones du stress, catécholamines et gluco-corticoïdes, ne semblent augmentées qu'en cas d'AVC massif (MCAO) et pas d'AVC modéré (coagulation de l'artère cérébrale moyenne). Un lien entre cette activation et le contexte inflammatoire peut être évoqué car l'augmentation des catécholamines induit une altération de la sécrétion d'interféron gamma par les lymphocytes via le récepteur β2-adrénergique, qui semble jouer un rôle dans la mort des leucocytes (Mracsko et al. 2014).

Une autre cascade de signalisation a été évoquée pour expliquer les conséquences cardiaques de l'ischémie cérébrale. Suite à une MCAO, l'expression du collagène cardiaque, classiquement impliqué dans le remodelage, n'est pas augmentée voire même diminuée ce qui tend à évoquer un processus plus lié à une signalisation atrophique qu'hypertrophique. Afin d'explorer cette hypothèse de « fonte » du muscle cardiaque, l'expression de protéines connues pour réguler l'atrophie des muscles striés squelettique et cardiaque a été étudiée. Ainsi, l'expression de l'atrogin-1 et de la protéine murf-1 (muscle ring finger protein) était augmentée suite à la MCAO. L'expression de ces protéines et l'atrophie cardiaque étant étroitement liées à l'innervation autonome, les taux de NA ont été étudiés. La NA était fortement augmentée au sein du tissu cardiaque mais pas l'activité de l'enzyme responsable de sa synthèse (tyrosine hydroxylase) ce qui indiquerait l'implication de mécanismes en relation avec la libération ou la recapture de NA plutôt qu'avec la seule synthèse de NA (Veltkamp et al. 2019).

5. Traitements envisageables afin de limiter l'impact cardiovasculaire de l'ischémie cérébrale

Comme nous l'avons vu chez l'Homme, il est possible d'envisager l'utilisation de traitements qui permettraient de diminuer l'impact cardiaque de l'AVC. Dans cette perspective d'amélioration et d'optimisation de la prise en charge des patients ayant subi un

AVC, de nombreuses études précliniques ont évalué chez l'animal différentes classes thérapeutiques.

Le resvératrol est un polyphénol retrouvé dans certains fruits comme le raisin, où il se trouve principalement dans la peau des grains. Il possède des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires et est présent de manière abondante dans certains jus de raisin et dans le vin rouge (très peu dans le vin blanc car la teneur en resvératrol dépend de la durée de macération de la peau dans le jus). Une étude expérimentale a montré que le resvératrol exerçait des effets bénéfiques au niveau cérébral après une MCAO, avec une diminution de la mortalité, de la taille d'infarctus et du déficit neurologique. Ses propriétés antioxydantes se manifestent par une augmentation du contenu cérébral en superoxyde dismutase associée à une diminution des taux cérébraux de malondialdéhyde. Le resvératrol jouerait également un rôle de cardioprotection après l'ischémie cérébrale avec une amélioration des paramètres cardiaques *in vivo*, tels que la pression ventriculaire gauche télé-systolique, de la contractilité et de la relaxation ventriculaires gauches, et une diminution de la concentration plasmatique de marqueurs enzymatiques de nécrose cellulaire comme la lactate déhydrogénase et la créatine kinase (Wang, Liu, et al. 2014).

Le microARN-126 serait impliqué dans le contrôle du remodelage et de la fibrose vasculaires. Il a été établi que le microARN-126 était diminué dans le sérum et le tissu cardiaque après MCAO droite et que cette diminution pourrait contribuer à la dysfonction cardiaque induite par l'ischémie cérébrale. En effet, des souris KO pour ce microARN-126 avaient une fraction d'éjection ventriculaire gauche plus faible, une augmentation de l'hypertrophie des cardiomyocytes et de la fibrose cardiaque ainsi que de l'inflammation et du stress oxydant cardiaque (Chen et al. 2017). Ce microARN-126 pourrait donc être une cible de traitement pour limiter l'impact cardiaque de l'AVC.

Les travaux de Bieber et coll. ont montré qu'un traitement par un β-bloquant cardiosélectif (métoprolol) prévenait la dysfonction systolique induite par une MCAO droite et liée à une augmentation du SNA sympathique. L'administration orale de ce traitement était initiée juste après la chirurgie et poursuivie pendant 8 semaines, ce qui permettait de diminuer la FC, d'augmenter la fraction d'éjection du VG, de diminuer des biomarqueurs de dysfonction cardiaque ou de remodelage (peptide natriurétique de type B [BNP], matrix metallopeptidase 9 [MMP-9]) et les marqueurs d'inflammation (TNFα) et de diminuer les taux d'Ad, de NA et de cortisol plasmatiques (Bieber et al. 2017). Les effets protecteurs des β

-bloquants semblent donc s'exercer à la fois au niveau cardiaque et cérébral, et une autre étude a montré qu'un traitement post-ischémique par un β-bloquant cardiosélectif (esmolol ou landiolol) avait un effet neuroprotecteur avec notamment une diminution du déficit neurologique et de l'infarctus cérébral (Goyagi et al. 2010). L'équipe d'Orgah a mis en évidence que l'injection de Danhong, composé de médecine traditionnelle chinoise extrait à partir de sauge rouge et de Saflor, améliorait les anomalies rythmiques cardiaques post-MCAO via une signalisation béta-adrénergique (Orgah et al. 2018).

V. La cytokine growth differentiation factor 15 (GDF-15)

Toutes ces études, autant sur le plan clinique que sur le plan expérimental, indiquent que de nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans ces interactions entre l'ischémie cérébrale et la fonction cardiovasculaire. Parmi tous ces mécanismes potentiels, une cytokine émergente dans les pathologies cardiovasculaires à particulièrement attiré notre attention : il s'agit du GDF15.

1. Classification, récepteur et voies de signalisation

Le GDF15 également connu sous le nom de macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1), de non-steroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (NAG-1), placental transforming growth factor-β (PTGF-β), prostate derived factor (PDF) ou placental bone morphogenetic protein (PLAB) est une protéine qui fait partie de la superfamille du transforming growth factor-β (TGF-β). Les nombreux membres de cette superfamille sont des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire et jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, le développement et la réparation de lésions dans divers organes (Piek, Heldin, and Ten Dijke 1999). Le génome humain possède 33 gènes impliqués dans le codage des polypeptides de la famille des TGF-β (Derynck and Budi 2019). Il existe une grande diversité de ligands dans cette superfamille parmi lesquels trois TGF-β (1, 2 et 3), des activines, des inhibines, des bone morphogenetic proteins (BMPs), des growth differentiation factors (GDFs) (de Caestecker 2004). Les protéines de la famille des TGF-β déclenchent un signal intracellulaire via une liaison à leurs récepteurs (TBR) spécifiques de type I et de type II qui sont des sérine/thréonine kinases (Rochette et al. 2015). Il existe un troisième récepteur (type III) qui n'a pas d'activité de signalisation mais joue un rôle dans la présentation de la molécule aux deux autres récepteurs. La signalisation du TGF-β est connue pour avoir un rôle pléiotrope et est notamment impliquée dans les processus inflammatoires.

Le récepteur au GDF15 a été récemment découvert, il s'agit du glial-derived neurotrophic factor (GDNF)-family receptor α-like (GFRAL). Avec cette découverte, le GDF15 semble étroitement lié aux GDNFs. Ce récepteur orphelin du GDF15 est un parent éloigné des récepteurs pour une classe distincte de ligands de la superfamille des TGF-β (Mullican et al. 2017). L'expression de ce récepteur est limitée aux neurones du cerveau postérieur avec notamment *l'area postrema* et le noyau du tractus solitaire et est absente dans les tissus périphériques (Emmerson et al. 2017) (Yang et al. 2017). Le GFRAL nécessite un

corécepteur tyrosine-kinase transmembranaire, le récepteur RET. En l'absence du récepteur RET, aucune signalisation n'est déclenchée par la fixation du GDF15 au récepteur GFRAL et à l'inverse, cette fixation est nécessaire pour le recrutement du récepteur RET (Yang et al. 2017) (Hsu et al. 2017). En effet, les membres de la famille des GDNFs, qui sont essentiels pour le développement et la survie de certains neurones, ont une signalisation commune qui implique le récepteur RET (Airaksinen, Holm, and Hatinen 2006). Les ligands de la famille des GDNFs (GFLs) comprennent 4 facteurs structurellement proches : le GDNF, la neurturine, l'artemine et la persephine (Fielder et al. 2018). Ces GFLs transmettent un signal via le récepteur RET grâce à leur liaison à un récepteur spécifique à chaque ligand qui est un glycosyl-phosphatidyl-inositol lié à la protéine membranaire GDNF familly receptor-α (GFR-α).

L'ensemble des GFR-α et GFRAL fixent leurs ligands respectifs. Lors de l'interaction avec le complexe ligand-GFR-α/GFRAL, le corecepteur tyrosine-kinase RET subit une phosphorylation ce qui permettra d'activer potentiellement plusieurs cascades de signalisation cellulaire. Si on s'intéresse seulement à l'interaction GFRAL-RET, le GDF15 pourrait activer les voies Akt, ERK1/2 et phospholipase C (PLCγ) mais pas les voies small mothers against decapentaplegic (Smad) (Tsai et al. 2018). Il a également été mis en évidence une augmentation des taux de protéine ERK phosphorylée chez la souris ce qui souligne l'importance de la signalisation RET/GDF15/GFRAL dans la signalisation neuronale (Hsu et al. 2017). Ces découvertes récentes vont à l'encontre de la signalisation des autres membres de la superfamille des TGF-β non-GDNF qui eux se fixent sur les récepteurs TBRI et TBRII. Dans ce cas, l'activité serine/thréonine kinase du TRBII conduit à la trans-phosphorylation du TRBI qui va activer les voies de signalisation Smad mais également d'autres voies telles que celles des MAPKs (Derynck and Zhang 2003). Des études ont montré que le GDF15 pouvait se fixer sur les TRBs dans les tissus périphériques mais ces données ne sont pas confirmées par les travaux récents. Il a cependant été démontré que dans les cellules dendritiques et les splénocytes, il n'y avait pas d'expression de GFRAL mais bien des TRBs et que ces derniers étaient utilisés pour la signalisation du GDF15 (Zhang et al. 2018). Une étude a souligné le fait que la signalisation induite par le GDF15 recombinant pourrait être due à une contamination par du TGF-β et non au GDF15 lui-même (Olsen et al. 2017). Le constat doit donc être fait que nous sommes en pleine acquisition de nouvelles connaissances sur les voies de signalisation empruntées par le GDF15 et qu'il est actuellement difficile de donner une

réponse précise sur cette cascade. La Figure 5 représente les voies de signalisation du GDF15 en l'état actuel des connaissances.

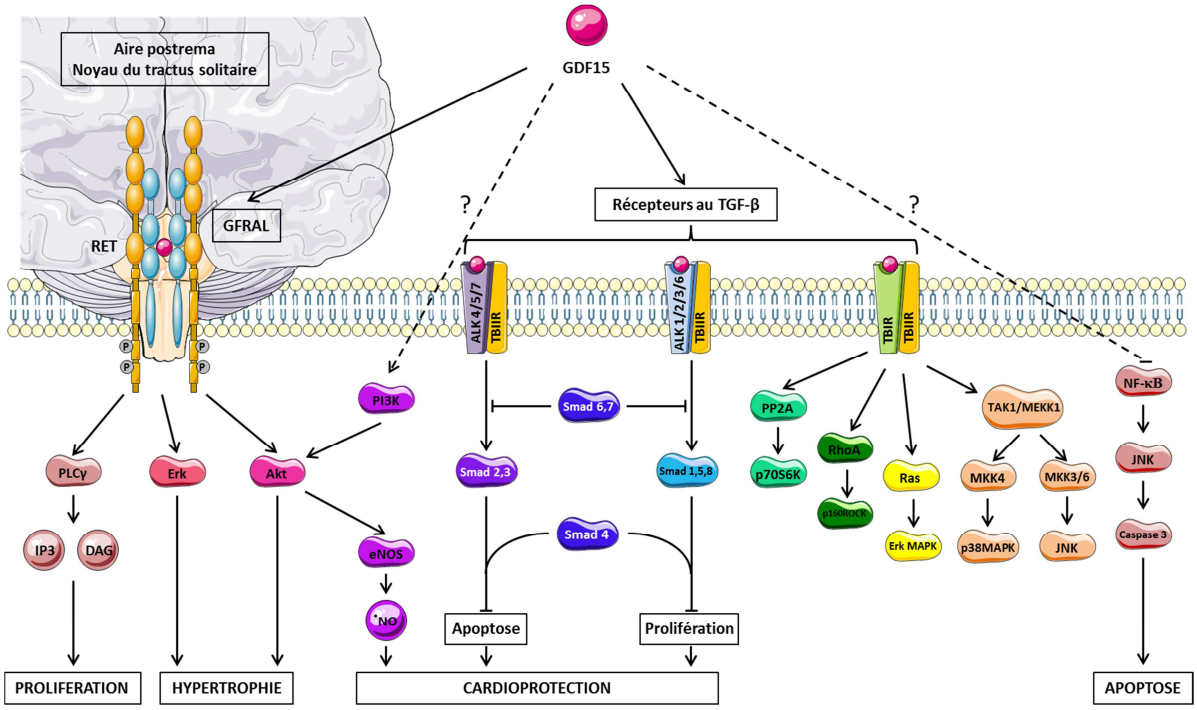


Figure 5 : Voies de signalisation du GDF15 : Akt : protéine kinase B, ALK4/5/7 et ALK1/2/3/6 : récepteurs au TGF-β de type 1, DAG : diacylglycérol, eNOS : NO synthase endothéliale, Erk : extracellular signal-regulated kinase, Erk MAPK : Erk mitogen-activated protein kinases, GFRAL : glial-derived neurotrophic factor-family receptor α-like, IP3 : inositol triphosphate, JNK : c-jun N-terminal kinases MKK : mitogen-activated protein kinase kinase, NF-κB : facteur nucléaire kappa B, NO : monoxyde d'azote, p160ROCK : protéine sérine/thréonine kinase, p38MAPK : p38 mitogen-activated protein kinases, p70S6K : ribosomal protein S6 kinase beta-1, PI3K : phosphoinositide 3-kinase, PLCγ : phospholipase C γ, PP2A : protéine phosphatase 2, Ras : Serine kinase, RET : corécepteur tyrosine-kinase, RhoA : Famille de gènes homologues de Ras, membre A, Smad : small mothers against decapentaplegic, TAK1/MEKK1 : mitogen-activated kinase kinase kinase, TBIR : récepteur au TGF-β de type 1, TBIIR : récepteur au TGF-β de type 2, TGF-β : transforming growth factor-β.

2. Synthèse, sécrétion, distribution et régulation

Le gène humain du GDF15 est situé sur le chromosome 19 et a été localisé dans la sous-région p12-13.1 par hybridation in-situ en fluorescence (FISH). Il est composé de 2 exons séparés par un intron et correspond à une séquence d'ADN de 3 020 paires de bases (Lawton et al. 1997). Les concentrations sanguines de GDF15 semblent être influencées par des facteurs génétiques. Une étude a montré que les concentrations de GDF15 était associées à un locus situé sur le chromosome 19p13.11 (Ho et al. 2012). Dans une autre étude il existait une similitude dans les taux sériques de GDF15 chez des jumeaux homozygotes avec une corrélation qui laissait penser à une hérédité (Wiklund et al. 2010). D'autres gènes, situés sur les chromosomes 1 et 19, semblent être impliqués dans la régulation des taux sanguins de GDF15 (Jiang et al. 2018).

La protéine humaine GDF15 est sécrétée sous forme d'un précurseur de 308 acides aminés composé d'un peptide signal (29 aa), d'un propeptide (167 aa) et de la protéine mature (112 aa) (Bootcov et al. 1997) (Bauskin et al. 2000) (Figure 6). L'extrémité N-terminale du précurseur est éliminée par protéolyse et il s'effectue une homodimérisation dans le réticulum endoplasmique via des ponts disulfures pour former le proGDF15. Ce dernier sera clivé au niveau du site RXXR par une protéase furin-like dans l'appareil de Golgi (Bauskin et al. 2005). Ce clivage conduit à un fragment N-terminal, le propeptide qui possède un site de N-glycosylation et au GDF15 mature qui correspond à la portion C-terminale. C'est la forme biologiquement active de la molécule qui sera sécrétée sous forme d'homodimère dans la matrice extracellulaire et se retrouvera dans la circulation sanguine. Le GDF15 mature contient 2 résidus cystéine en plus des 7 cystéines conservées qui sont nécessaire à la formation d'un nœud cystéine. Ces 9 cystéines sont également retrouvées chez plusieurs autres membres de la superfamille des TGF-β et le nœud cystéine correspond à un domaine hautement conservé de cette famille (Bottner et al. 1999). Contrairement aux autres membres de la superfamille des TGF-β, le propeptide n'est pas forcément requis pour avoir une bonne conformation spatiale et permettre la sécrétion du GDF15 mature (Fairlie et al. 2001). Le proGDF15 non fonctionnel est aussi sécrété et interagit avec la matrice extracellulaire par l'intermédiaire du propeptide notamment au niveau du stroma. Il est suggéré que le propeptide du proGDF15 modulerait les taux sériques de GDF15 (Bauskin et al. 2005). Certaines convertases sont exprimées dans la matrice extracellulaire et pourraient jouer un rôle dans l'activité biologique du proGDF15 extracellulaire (Tsuji et al. 2003).

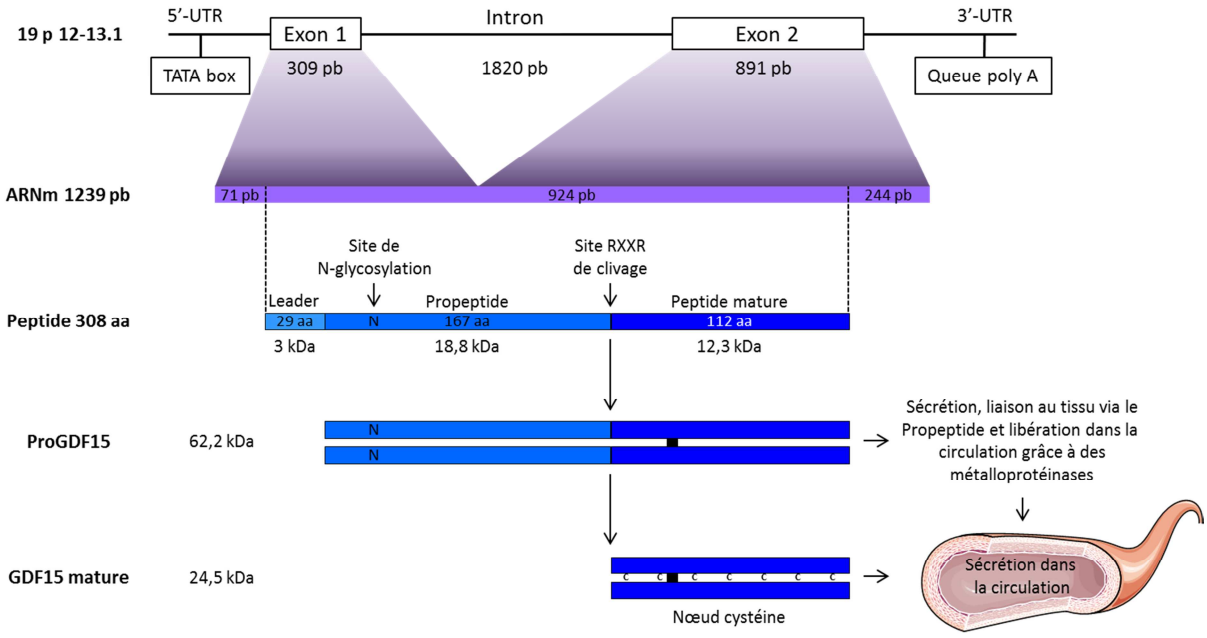


Figure 6 : Synthèse et sécrétion du GDF15.

Physiologiquement, le GDF15 est faiblement exprimé dans les tissus à l'exception du placenta. En effet, on observe des taux circulants très élevés de GDF15 chez les femmes enceintes (Hromas et al. 1997) (Moore et al. 2000). L'expression du GDF15 est modérée dans les reins, les poumons, le pancréas, la prostate et le muscle squelettique et est faible dans le cerveau et le foie (Li et al. 2000). Chez l'Homme en bonne santé, les taux circulants de GDF15 varient autour de 800 ng/L. Les taux circulants de GDF15 augmentent avec l'âge mais ne semblent pas liés au sexe et sont reliés aux concentrations de cystatine-C et de CRP (Kempf et al. 2007). D'autres facteurs peuvent influencer les taux sanguins de GDF15 à l'instar de certains facteurs de risque cardiovasculaire comme l'HTA, le diabète, le tabagisme actif et le bilan lipidique (HDL-cholestérol, LDL-cholestérol, triglycérides). Indépendamment de ces facteurs de risque, le GDF15 est lié à d'autres biomarqueurs 1/ de l'inflammation comme la CRP, 2/ de maladies cardiaques comme le BNP, le NT-proBNP ou les troponines cardiaques et 3/ de dysfonctions rénales tels que la cystatine-C et le débit de filtration glomérulaire (Lind et al. 2009) (Daniels et al. 2011) (Rohatgi et al. 2012) (Wallentin et al. 2013) (Kahli et al. 2014) (Guenancia et al. 2015). Si on s'intéresse plus spécifiquement à l'expression du GDF15 au niveau cardiaque, celle-ci est relativement faible dans les conditions physiologiques mais une induction est observée en conditions pathologiques telles qu'une ischémie ou une inflammation (Falk et al. 2018). Différentes études tendent à montrer que le GDF15 est une cytokine cardioprotectrice (Planavila, Fernandez-Sola, and Villarroya 2017). En effet, le GDF15 diminue l'étendue des altérations myocardiques après une ischémie-reperfusion alors que des souris KO pour ce gène ont des tailles d'infarctus et une apoptose des cardiomyocytes plus importantes. Il est suggéré que cette réponse au stress soit exercée par un effet autocrine ou paracrine (Kempf et al. 2006). Une autre étude a montré que l'étirement cardiaque induisait une expression intense du GDF15 et il semblerait que cette régulation soit spécifique des cardiomyocytes puisque non retrouvée au niveau des fibroblastes (Frank et al. 2008).

Un nombre croissant de travaux tendent à démontrer que l'expression du GDF15 serait régulée par différents facteurs de stress et autres stimuli d'ordre pathologique (Figure 7). L'hypoxie et l'anoxie sont des situations qui conduisent à l'induction du GDF15 dans certains territoires comme dans les cellules épithéliales des pigments rétiniens, dans le cancer colorectal ou dans les gliobastomes. Les mécanismes d'induction passent par les facteurs induits par l'hypoxie (HIF) ou d'autres voies alternatives (Ponnaluri et al. 2011) (Krieg et al. 2010) (Albertoni et al. 2002). Au niveau macrophagique, l'expression du GDF15 peut être

stimulée par des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1β (IL-1β), le TNFα, l'IL-2 ou encore le TGF-β (Emmerson et al. 2018). Les rayons UV semblent activer la production de GDF15 au niveau du derme (Akiyama et al. 2009). Il apparait qu'une régulation transcriptionnelle est impliquée dans l'ensemble de ces processus. Le promoteur du gène du GDF15 contient des sites de fixation pour plusieurs facteurs transcriptionnels tels que la protéine suppresseur de tumeur p53 (2 sites de fixation), le Sp1, l'activating transcription factor 3 (ATF3), l'HIF1α, le NFκB, … L'expression de GDF15 est augmentée par les ligands peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ ainsi que par la voie PI3K/Akt/GSK3β. Une régulation épigénétique du GDF15 médiée par une méthylation a également été mise en évidence (Kadowaki et al. 2012). D'autres mécanismes peuvent être impliqués dans l'expression du GDF15 comme certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou certains anticancéreux (étoposide, doxorubicine) (Altena et al. 2015) (Fujita et al. 2016) (Schernthaner et al. 2017) (Baek and Eling 2019).

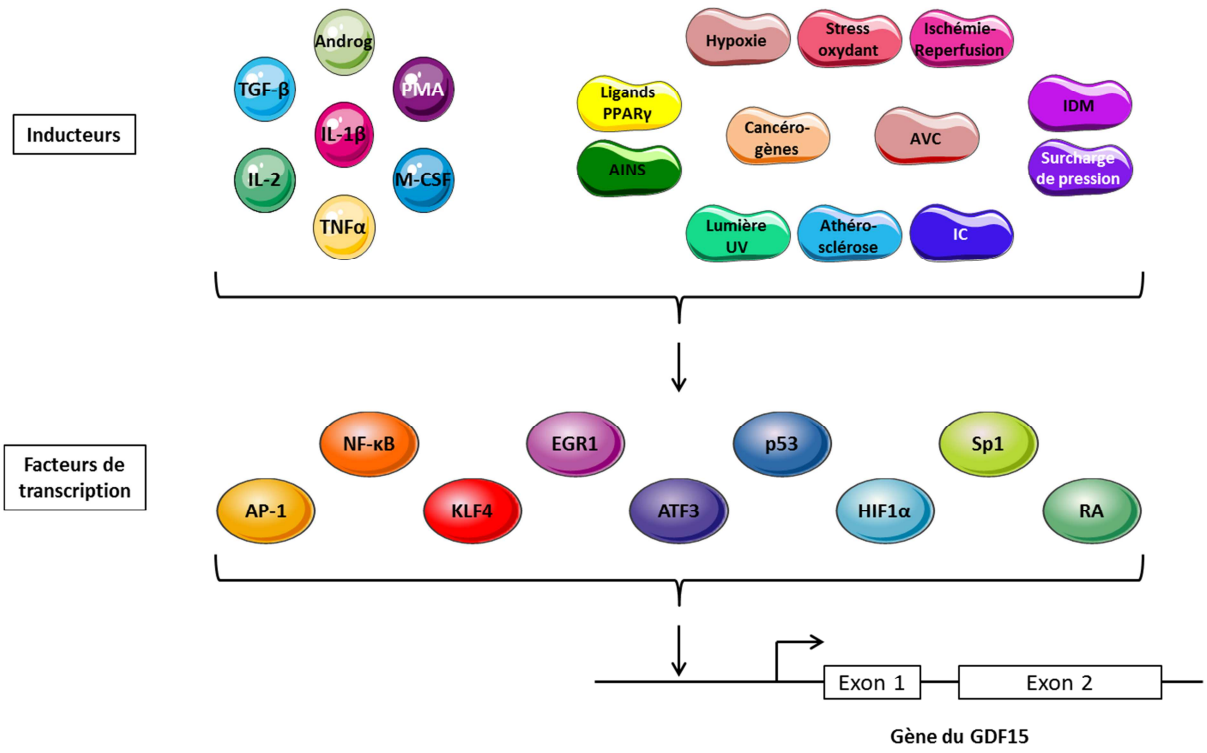


Figure 7 : Schéma de régulation de l'expression du gène du GDF15 (inspiré de (Fujita et al. 2016) et (Ago and Sadoshima 2006)) : AINS : antiinflammatoires non stéroïdiens, Androg : androgène, AP-1 : protéine activatrice 1, ATF3 : facteur 3 activant la transcription, AVC : accident vasculaire cérébral, EGR1 : protéine de réponse de croissance précoce 1, HIF1α : facteur induit par l'hypoxie, IC : insuffisance cardiaque, IDM : infarctus du myocarde, IL : interleukine, KLF4 : facteur 4 de type kruppel, M-CSF : macrophage colony-stimulating factor, NF-κB : facteur nucléaire kappa B, p53 : protéine suppresseur de tumeur, PMA : phorbol myristate acetate (activateur de protéine kinase C), PPARγ : récepteur activé par les prolifératreurs de peroxysomes, RA : récepteur aux androgènes, TGF-β : transforming growth factor-β, TNF : facteur de nécrose tumorale, UV : ultra-violette.

3. GDF15 dans les pathologies cardiovasculaires

L'athérosclérose est une maladie caractérisée par un déséquilibre entre le métabolisme lipidique et l'inflammation vasculaire chronique. Le développement de la plaque d'athérosclérose est initié par une dysfonction endothéliale induite par des facteurs de risque et la progression de la plaque implique une oxydation des LDL présentes dans l'espace sous-endothélial, suivie de l'infiltration monocytaire de la paroi artérielle qui va entrainer une inflammation locale chronique (Chen et al. 2018). En effet, après avoir pénétré dans l'espace sous-endothélial, les monocytes se différencient en macrophages qui d'une part vont capter le LDL oxydé via les récepteurs scavengers et se transformer en cellules spumeuses et d'autre part produire des cytokines proinflammatoires (TNF-α, IL-1, …) qui entretiennent le caractère inflammatoire de la plaque et participent à sa transformation, notamment via le changement phénotypique des cellules musculaires lisses de la média. Le GDF15 semble fortement surexprimé dans les macrophages après stimulation par le LDL oxydé ou le TNF-α. Le GDF15 parait ainsi moduler les processus inflammatoires et apoptotiques des macrophages activés (Schlittenhardt et al. 2004). Le GDF15 est impliqué dans l'orchestration des lésions athérosclérotiques avec mise en place d'une réponse proinflammatoire et un effet proapoptotique. Une déficience en GDF15 chez la souris réduit le développement des lésions d'athérosclérose en modulant la réponse inflammatoire dépendante de l'IL-6 (Bonaterra et al. 2012). Une autre étude a montré que la déficience en GDF15 atténuait l'athérogénèse précoce en améliorant la stabilisation de la plaque via une atténuation du chimiotactisme macrophagique médié par les récepteurs CCR2. Tous ces processus sont accompagnés d'un effet anti-inflammatoire qui va limiter l'accumulation de macrophages, diminuer les processus de nécrose et d'apoptose ainsi que la production de collagène. Ces évènements auront pour conséquence de modifier la composition de la plaque (de Jager et al. 2011). Il a été récemment démontré que le GDF15 influençait l'accumulation de lipides et de protéines d'autophagie, ce qui souligne un rôle important dans la physiopathologie du développement et de la progression de la plaque d'athérosclérose (Ackermann et al. 2019). A l'inverse, une autre étude conduite chez des souris ayant reçu une greffe de moelle osseuse montre que le GDF15 jouerait un rôle protecteur dans l'athérosclérose avancée et dans l'accumulation de macrophages, possiblement en raison d'une diminution des molécules d'adhésion (Preusch et al. 2013).

Les concentrations de GDF15 sont augmentées chez les patients présentant des antécédents d'IDM ou d'IC et en cas de pathologies multi-vaisseaux (Wollert, Kempf,

Lagerqvist, et al. 2007). Cette augmentation est observée dès les premières heures qui suivent l'IDM. Les taux plasmatiques de GDF15 sont augmentés aussi bien chez les patients qui font un IDM avec ou sans élévation du segment ST (Schernthaner et al. 2017). Bien que le GDF15 soit exprimé au niveau du tissu cardiaque infarci, ses concentrations dans les syndromes coronariens aigus (SCA) ne semblent pas être liées à l'ampleur des dommages cardiaques représentés par la taille de l'infarctus (Kempf et al. 2006) (Eitel et al. 2011). Contrairement aux troponines cardiaques qui vont décroitre rapidement après l'IDM, les taux de GDF15 restent relativement stables dans les mois qui suivent l'évènement (Eggers et al. 2010). Ceci semble suggérer que le GDF15 refléterait principalement le contexte de maladie chronique de ces patients. Le GDF15 est reconnu comme un biomarqueur de mortalité et d'évènements cardiovasculaires chez les patients avec un SCA ou une maladie coronaire stable. Les patients dont les taux de GDF15 sont supérieurs à 1 800 ng/L présentent un haut risque de mortalité à 1 voire 2 ans par rapport aux patients ayant des taux plus faibles (Kempf et al. 2006) (Wollert, Kempf, Peter, et al. 2007). Dans des études comprenant un nombre conséquent de patients, la corrélation des taux de GDF15 avec les évènements survenant durant la période de suivi a pu être explorée. Après ajustement sur certains critères biologiques, les fortes concentrations de GDF15 étaient bien associées à un risque de mortalité toutes causes, de mortalité cardiovasculaire et d'AVC (Hagstrom et al. 2016). Il a été montré qu'1 mois après un SCA, les taux de GDF15 étaient reliés au risque de saignement lors d'un traitement par double antiagrégation plaquettaire (Lindholm et al. 2017). Une autre étude a exposé le fait que le GDF15 constituerait un indicateur indépendant de saignements majeurs et de mortalité toutes causes chez les patients avec une FA sous traitement anticoagulant (Hijazi et al. 2017). Chez le rat soumis à une ligature coronaire de 60 minutes suivie de différents temps de reperfusion, les niveaux d'expression d'ARNm et de protéine du GDF15 sont augmentés et ont atteint leur maximum après 24 heures de reperfusion. Le GDF15 pourrait protéger le cœur en inhibant la réponse inflammatoire qui passe par l'infiltration des neutrophiles et la migration trans-endothéliale. Une autre étude a souligné le fait que des souris KO pour le GDF15 avaient un taux de mortalité supérieur après un IDM (Kempf et al. 2011) (Zhang et al. 2016). Une étude récente a montré que le GDF15 protégeait le cœur contre les lésions d'ischémie-reperfusion lors d'une transplantation cardiaque. Cet effet protecteur est médié par les signalisations du facteur nucléaire NF-κB et Foxo3 qui ont un rôle important dans le stress oxydant et anti-apoptotique (Zhang, Moszczynski, et al. 2017). Foxo3 est un régulateur positif de NF-κB qui agit comme un antagoniste de NF-κB (Li et al. 2012). L'angiogenèse est un processus de croissance de vaisseaux qui peut constituer un mécanisme de sauvegarde en réponse à une

hypoxie ou à une lésion d'ischémie-reperfusion, car elle permet d'augmenter localement le débit sanguin et les apports en oxygène et nutriments. Il a été démontré que le GDF15 pouvait promouvoir le phénomène d'angiogenèse, ce qui laisse envisager la possibilité que le GDF15 puisse être utilisé comme agent angiogénique en médecine régénérative. Le GDF15 exerce un effet similaire aux facteurs de croissance vasculaires endothéliaux (VEGF). Il promeut l'angiogenèse en inhibant le signal p53 qui va stabiliser et améliorer l'expression de HIF-1α (Song, Yin, and Liu 2012). Le GDF15 est associé au risque d'insuffisance rénale aigue chez les patients ayant bénéficié d'une angiographie coronaire au décours d'un IDM et les taux de GDF15 sont plus élevés chez les patients qui développent cette complication. D'ailleurs, le GDF15 et l'insuffisance rénale aigue sont associés à une faible survie à court terme des patients ayant présenté un IDM (Sun, Zhou, et al. 2018). Le GDF15 est un prédicteur de mortalité toutes causes à long-terme chez les patients IDM (Skau et al. 2017).

L'insuffisance cardiaque (IC) correspond à l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant pour les besoins de l'organisme. Cette pathologie constitue un problème majeur de santé publique et représente une part considérable des dépenses médicales totales. Il est donc nécessaire de traiter les patients au mieux et donc de détecter cette pathologie le plus tôt possible pour pouvoir mettre en œuvre des mesures préventives. Les taux de GDF15 sont significativement plus élevés chez les patients avec une IC chronique que chez les patients contrôles (Kempf et al. 2007). L'évaluation du GDF15 fournit des informations pronostiques sur l'IC avec notamment une association indépendante entre les teneurs circulantes et le risque de décès ainsi que le premier évènement morbide (Anand et al. 2010). Une méta-analyse a démontré l'intérêt du GDF15 comme marqueur de mauvais pronostic notamment dans le contexte d'IC (George et al. 2016). Dans le cas d'une IC à fraction d'éjection préservée ou réduite, les taux de GDF15 sont augmentés de manière similaire, contrairement aux concentrations de NT-proBNP ou de troponines C hypersensibles (Santhanakrishnan et al. 2012). Des taux élevés de GDF15 sont associés à un mauvais pronostic dans l'IC aigue, indépendamment et au-delà du BNP, en fournissant des informations physiopathologiques supplémentaires comme les lésions inflammatoires (Bettencourt et al. 2018). Un taux élevé de GDF15 est un puissant facteur prédictif de décès et d'IC chez les patients avec un IDM avec élévation du segment ST. Bien que les patients ayant des taux de GDF-15 plus élevés tendent à avoir une fraction d'éjection du VG plus basse, ils ont un degré d'augmentation de l'indice de volume télédiastolique du VG similaire à 6 mois (Lin et al. 2014).

4. GDF15 et AVC

Dans un contexte général de pathologies cérébro-vasculaires, des études montrent que le GDF15 est étroitement lié à un des facteurs étiologiques de l'AVC tel que l'athérosclérose. Les taux de GDF15 sont ainsi associés à la survenue d'un AVC ou d'un AIT et même d'un AVC ischémique après ajustement sur l'âge et le sexe (Andersson et al. 2015). Le GDF15 est considéré comme un facteur de risque indépendant d'AVC chez les patients présentant de la FA (Wallentin et al. 2014). Une étude récente a souligné le fait que les taux élevés de GDF15 étaient associés à la présence d'un thrombus dans l'oreillette gauche chez des patients avec de la FA non valvulaire, qui est une des principales étiologies d'AVC (Hu et al. 2018). Afin d'évaluer la relation entre le polymorphisme génétique du GDF15 et la susceptibilité d'AVC ischémique dans une population chinoise, certains auteurs ont découvert que la distribution du génotype rs1804826G/T était différente entre des patients ayant présenté un AVC et des patients contrôles appariés au niveau de l'âge et du sexe, ce qui tendrait à montrer que le GDF15, dont les taux sériques sont en partie reliés au génotype T, jouerait un rôle dans le développement de l'AVC ischémique (Xiang et al. 2017). Un autre travail réalisé sur des patients hypertendus sans histoire préalable d'AVC suivis 3 ans a montré que des taux élevés de GDF15 seraient un biomarqueur indépendant potentiel de premier AVC, en particulier ischémique (Wang et al. 2016). D'autres études plus anciennes avaient par ailleurs démontré qu'un taux de GDF15 élevé chez des patients présentant un AVC ischémique prédisait un mauvais score fonctionnel à 90 jours (Groschel et al. 2012) (Worthmann et al. 2011). Dans un contexte un peu différent, un autre travail a montré que des taux élevés de GDF15 indiquaient une réduction de l'intégrité de la substance blanche et éventuellement plus de pathologies de la substance blanche (Jiang et al. 2015).

Dans les modèles expérimentaux de rat et souris, l'expression d'ARNm de GDF15 est retrouvée principalement au niveau de l'épithélium du plexus choroïde, via lequel il serait secrété dans le liquide cérébrospinal. Lorsqu'on s'intéresse plus particulièrement aux rats nouveau-nés, le GDF15 est également exprimé dans les cellules épendymaires des ventricules cérébraux, au niveau thalamique et hippocampique. Une lésion cérébrale cryogénique chez le rat adulte induit l'expression de GDF15 au niveau du site de la lésion et de l'aire thalamique dorsale. Cette expression est particulièrement retrouvée au niveau des neurones, des macrophages et des cellules de la microglie (Schober et al. 2001). Le GDF15 est connu pour être un puissant facteur neurotrophique *in vitro* et *in vivo* dans les neurones dopaminergiques, exerçant des propriétés neuroprotectrices dans certaines maladies neurodégénératives (Strelau

et al. 2000). Suite à des lésions ischémiques induites par une MCAO gauche chez la souris, l'expression de GDF15 est fortement augmentée dans les zones lésées (cortex pariétal et hippocampe homolatéral) 3h et 24 h après la chirurgie. Le GDF15 est principalement exprimé par les neurones et à un moindre niveau dans dans les cellules de la microglie mais pas par dans les astrocytes. En revanche, chez des souris KO pour le GDF15 la taille de l'infarctus cérébral n'était pas plus importante que chez des souris sauvages, suite à une MCAO transitoire ou permanente (Schindowski et al. 2011). Il est possible que le GDF15, fortement exprimé dans le cerveau ischémié, participe à l'orchestration des réponses inflammatoires post-lésionnelles.

OBJECTIFS DE LA THESE

Dans ce contexte indiquant clairement que l'ischémie cérébrale, tant chez l'Homme qu'au niveau expérimental, induit des « dommages collatéraux » délétères sur le système cardiovasculaire, et sur le cœur en particulier, il nous a donc semblé essentiel d'étudier de quelle manière une ischémie cérébrale pouvait altérer la fonction cardiaque *in vivo* et *ex vivo*, et modifier la capacité ultérieure d'adaptation du cœur à un stress ischémique. Notre objectif s'est également tourné vers l'étude des changements moléculaires (géniques et protéiques) induits au niveau cardiaque par l'ischémie cérébrale, et notamment de quelle manière les voies de signalisation cardiaques impliquées dans la cardioprotection sont altérées. Pour ce faire, nous avons induit chez le rat une situation expérimentale d'AVC embolique et avons évalué comment la fonction cardiaque et la sensibilité du cœur à l'ischémie en étaient affectées, et quelles étaient les voies de signalisation cellulaires cardiaques qui en étaient modifiées. Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre les conditions d'apparition du GDF15 dans la circulation générale après une ischémie cérébrale, et pour ce faire, nous avons étudié l'expression génique et protéique du GDF15 dans différents tissus suite à une embolisation cérébrale.

MATERIELS ET METHODES

I. Animaux

Des rats Wistar mâles (Charles River, Ecully, France et animalerie centrale de l'université de Bourgogne, Dijon, France) de 8-9 semaines et pesant 300±50 g ont été utilisés. Les animaux étaient hébergés dans des cages placées dans des pièces à température thermostatée (21±2°C) avec une humidité constante (55±10%) sous un cycle de 12 heures jour/nuit avec accès illimité à l'eau et à un régime standard *ad libitum*. Les expériences sont en accord avec la directive 2010/63/EU du Parlement Européen, elles ont été effectuées en conformité avec le Guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire publié par le United States National Institutes of Health (NIH Publication no. 85-23, révisée en 1996) et ont été approuvées par le comité d'éthique local (comité d'éthique de l'Université de Bourgogne).

II. Modèle d'embolisation cérébrale

Les embolisations cérébrales ont été réalisées à l'aide de microsphères en polystyrène (90 µm de diamètre, Polysciences, Inc., Warrington, USA). La solution commerciale était diluée de manière à injecter, à chaque animal, environ 4 000 microsphères en suspension dans 200 µL d'une solution de polyvinylpyrrolidone (PVP) à 20%. L'anesthésie était réalisée sous isoflurane à 3,5% dans de l'oxygène et de la lidocaine/prilocaine était appliquée pour une anesthésie locale. Après exposition de l'artère carotide commune gauche ou droite, la dissection était poursuivie jusqu'à la bifurcation et l'artère carotide externe était ligaturée. Les microsphères étaient injectées dans l'artère carotide commune avec une aiguille de 26 $G^{1/2}$ connectée à une seringue contenant 200 µL de la suspension de microsphères et 100 µL de solution de PVP à 20% de manière à pousser les microsphères dans le flux sanguin. L'injection était réalisée très doucement, pendant environ 1 minute et sans interruption du flux sanguin, ce qui permettait aux microsphères d'atteindre le cerveau via l'artère carotide interne et ainsi de causer de multiples infarctus disséminés. Pour le groupe d'animaux Sham, 300 µL de PVP 20% étaient injectés sans microsphères. L'artère carotide commune était ensuite ligaturée en-dessous et au-dessus du point d'injection et la plaie était refermée à l'aide d'agrafes chirurgicales. La température corporelle était maintenue à 37±0,5°C pendant toute la procédure. Tous les animaux ont été opérés par le même expérimentateur afin de limiter la variabilité de l'étendue de l'infarctus.

III. Evaluation du déficit neurologique, détermination de l'embolisation cérébrale et de la taille de l'infarctus

Le déficit neurologique était évalué 2 heures, 24 heures et 7 jours après la chirurgie, en utilisant le score modifié de Longa (Longa et al. 1989) par un expérimentateur en aveugle des groupes d'animaux. Le déficit était coté de la manière suivante :

- ✓ 0 : Pas de déficit observable (Normal)
- ✓ 1 : Raideurs des membres (Léger)
- ✓ 2 : Fait des mouvements circulaires du côté controlatéral mais posture normale au repos (Modéré)
- ✓ 3 : Penche du côté controlatéral au repos (Sévère)
- ✓ 4 : Pas d'activité motrice spontanée

Les scores les plus hauts représentaient une déficience motrice plus grave.

Le degré d'embolisation cérébrale était systématiquement déterminé via le nombre de microsphères retrouvées dans chaque hémisphère. Après décapitation, le cerveau était retiré avec précaution de la boite crânienne et chaque hémisphère était plongé dans 5 mL de potasse à 20%. Après au moins 48 h, les solutions étaient homogénéisées par vortex et centrifugées à 1 300 g pendant 45 minutes. 3 mL de surnageant étaient éliminés et les microsphères étaient comptées dans des gouttelettes de 50 µL. Le ratio du nombre de microsphères sur le volume de solution contenant les microsphères était calculé afin de déterminer le nombre de microsphères piégées dans chaque hémisphère.

24 heures après l'embolisation cérébrale, l'étendue de l'infarctus cérébral était évalué. Les cerveaux étaient congelés pendant 20 minutes puis découpés en tranches transversales d'environ 1 mm d'épaisseur. Les tranches étaient ensuite immergées dans une solution de 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC, Sigma-Aldrich T-8877, Saint-Louis, USA) dans un tampon phosphate (pH 7,4 ; 37°C) pendant 20 minutes puis incubés pendant plusieurs heures dans de la paraformaldehyde à 4% à température ambiante. Les sections cérébrales colorées étaient scannées et les images obtenues étaient analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse (Image J). Le volume de l'AVC est présenté en pourcentage de l'aire cérébrale totale.

IV. Evaluation de la fonction cardiaque in vivo par échocardiographie

Des échocardiographies trans-thoraciques, en utilisant le système d'imagerie Vevo770^{TM} (VisualSonics Inc., Toronto, Canada) équipé avec une sonde de 25 MHz, ont été réalisées 7 jours avant la chirurgie puis 2 h, 24 h et 7 jours après la chirurgie chez les rats. Brièvement, les rats étaient anesthésiés avec de l'isoflurane à 5% pour l'induction puis à 2% dans de l'oxygène pour la phase d'entretien. La température du rat était monitorée en utilisant une sonde rectale et une lampe infrarouge chauffante pour maintenir la température à 37±0,5°C tout au long de la procédure. Un signal ECG était enregistré grâce à des électrodes au niveau des pattes sur une plateforme chauffée. Les poils de la poitrine ont été enlevés à l'aide d'une crème dépilatoire afin de minimiser l'atténuation des ultrasons. La sonde à ultrasons (RMV-710B) a été placée sur la poitrine des rats en utilisant un gel à ultrasons tiède comme milieu de couplage. Des images bidimensionnelles ont été enregistrées dans les vues parasternales en grand axe et en petit axe pour guider les enregistrements en mode M obtenus au niveau mi-ventriculaire, avec 3 à 5 mesures pour chaque vue afin d'établir une moyenne. Les épaisseurs de paroi du septum interventriculaire et de la paroi postérieure du ventricule gauche, ainsi que les dimensions internes diastoliques et systoliques du VG ont été mesurées et les valeurs moyennes ont été rapportées. La fonction systolique du VG a été calculée à partir des mesures en mode M, conformément aux recommandations du comité de l'American Society of Echocardiography. La fraction de raccourcissement et la fraction d'éjection ventriculaire gauche ont été calculées. Des études Doppler pulsées de la fonction diastolique du VG ont été réalisées dans la vue apicale à 4 cavités avec le curseur Doppler orienté parallèlement au plan longitudinal du VG. La sonde était placée juste au-dessous du niveau de la valve mitrale et ajustée pour obtenir le pic de vitesse d'écoulement diastolique précoce le plus élevé du signal de flux transmetteur Doppler. Il y avait souvent un besoin de correction d'angle qui était toujours inférieure à 20 degrés. La vitesse maximale diastolique précoce et tardive (E, A) et leur rapport (E/A) ont été dérivés de la forme d'onde Doppler transmitrale. Les intervalles systoliques ventriculaires gauche du temps de contraction isovolumique, le temps d'éjection ventriculaire et les intervalles diastoliques du temps de relaxation isovolumique ont également été dérivés de la forme d'onde Doppler transmitrale. Juste avant de procéder à l'échocardiographie, la pression artérielle systolique a été mesurée à l'aide de la méthode validée du brassard caudal. Pour chaque rat, les moyennes des deux SBP ont été calculées avec 3-5 mesures.

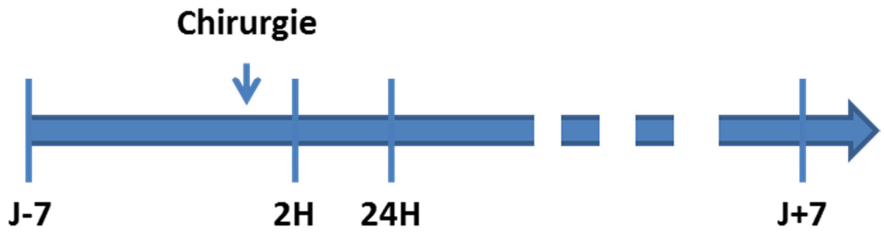


Figure 8 : Frise chronologique de l'évaluation de la fonction cardiaque *in vivo* par échocardiographie et mesure de la pression artérielle

V. Evaluation de la fonction cardiaque ex vivo par la méthode de Langendorff

Deux heures et 24 heures après embolisation cérébrale, les rats étaient anesthésiés profondément grâce à une injection intrapéritonéale létale de pentobarbital de sodium à 110 mg/kg associée à une co-administration d'héparine à 500 UI/kg pour prévenir la formation de caillots sanguins. Après une perte totale de nociception, le thorax était ouvert et le cœur était prélevé et placé rapidement dans un bain glacé (4°C) de tampon pour stopper les battements cardiaques. Le cœur était ensuite immédiatement canulé via l'aorte et perfusé via la méthode de Langendorff. Brièvement, le cœur était perfusé à une pression constante de 80 mmHg. Le tampon de perfusion (tampon de Krebs-Henseleit) était composé de : NaCl 118 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, $MgSO_4$ 1,2 mM, glucose 5,5 mM et $CaCl_2$ 2 mM. Le liquide de perfusion était saturé avec de l'O_2 95% et CO_2 5% à 37°C et à pH de 7,4. Un ballonnet en latex rempli de solution saline était inséré dans le VG et connecté à un capteur de pression de manière à mesurer la pression intra-ventriculaire. Le volume du ballon était ajusté pour imposer une pression diastolique de 7-13 mmHg, permanente en période basale. Les données fonctionnelles étaient enregistrées à l'aide du logiciel LabChart system (ADInstruments, Sydney, Australia) connecté à un ordinateur. Le débit coronaire (DC), la FC, la pression télé-diastolique du VG (Pdia), la pression télé-systolique du VG (Psys), la pression développée par le ventricule gauche (Pdev = Psys - Pdia) et la première dérivée de la Pdev : la force d'éjection du VG (+dP/dt) et la relaxation (-dP/dt) ont été enregistrés tout au long des expériences. Les cœurs isolés étaient initialement perfusés pendant 10 à 15 minutes de stabilisation puis les paramètres cardiaques de base ont été enregistrés pendant 10 minutes.

VI. Mesure de la vulnérabilité du myocarde aux lésions d'ischémie-reperfusion ex vivo

Après les mesures basales, la perfusion était stoppée afin d'induire 20 ou 30 minutes d'ischémie globale totale normothermique, suivies d'1 heure de reperfusion. Tous les paramètres précédents ont été monitorés pendant l'ischémie et la reperfusion.

VII. Détermination des concentrations plasmatiques d'Ad, de NA et GDF15

Deux heures et 24 h après embolisation cérébrale, le sang était collecté via l'aorte abdominale et immédiatement centrifugé à 4°C de manière à séparer le plasma et les échantillons étaient stockés à -80°C. Les taux d'Ad et de NA ont été mesurés en utilisant le kit 2-CAT (A-N) Research ELISA (BA E-5400; Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Allemagne) en suivant les recommandations du fournisseur. Les taux plasmatiques de GDF15 ont été mesurés à l'aide d'un kit du commerce (MGD150, R&D systems, Minneapolis, USA).

VIII. Réaction de polymérisation en chaine (PCR) quantitative en temps réel

Des analyses semi-quantitatives de la NO synthase endothéliale (eNOS), de la glutathion peroxydase 1 (GPX1), de la catalase (CAT), du récepteur β1-adrénergique (ADRB1), de JAK2 et de STAT3 ont été réalisées. L'ARN total était extrait des échantillons de cœurs congelés dans un tampon Qiazol (Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, France). Un autre gène a été étudié, il s'agit du GDF15. Pour ce dernier, l'ARN total a été extrait de différents tissus cérébraux (tronc cérébral, cervelet, cortex homolatéral et controlatéral), du cœur, du poumon, du foie, du muscle et enfin du sang. La qualité et les quantités finales d'ARN ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose (Agilent2100 bioanalyzer, Agilent technologies, Waldbronn, Allemagne) et mesurées via un spectrophotomètre (Nanodrop 1000, Thermo Fisher scientific, Wilmington, USA). L'ARN messager (1 µg) était rétrotranscrit avec une reverse transcriptase MMLV (Invitrogen, id.) en utilisant des amorces aléatoires (Invitrogen, id.) en accord avec les instructions du fabricant. La PCR quantitative en temps réel était effectuée à partir de 2 µL d'ADN complémentaire avec du SYBR-Green Master-Mix (Applied Biosystems) et des amorces sens et anti-sens (5 µM) dans un volume final de 20 µL et à l'aide d'un système StepOne-Real-Time PCR (Applied Biosystems). Les amorces ont été conçues et comparées en utilisant le site internet

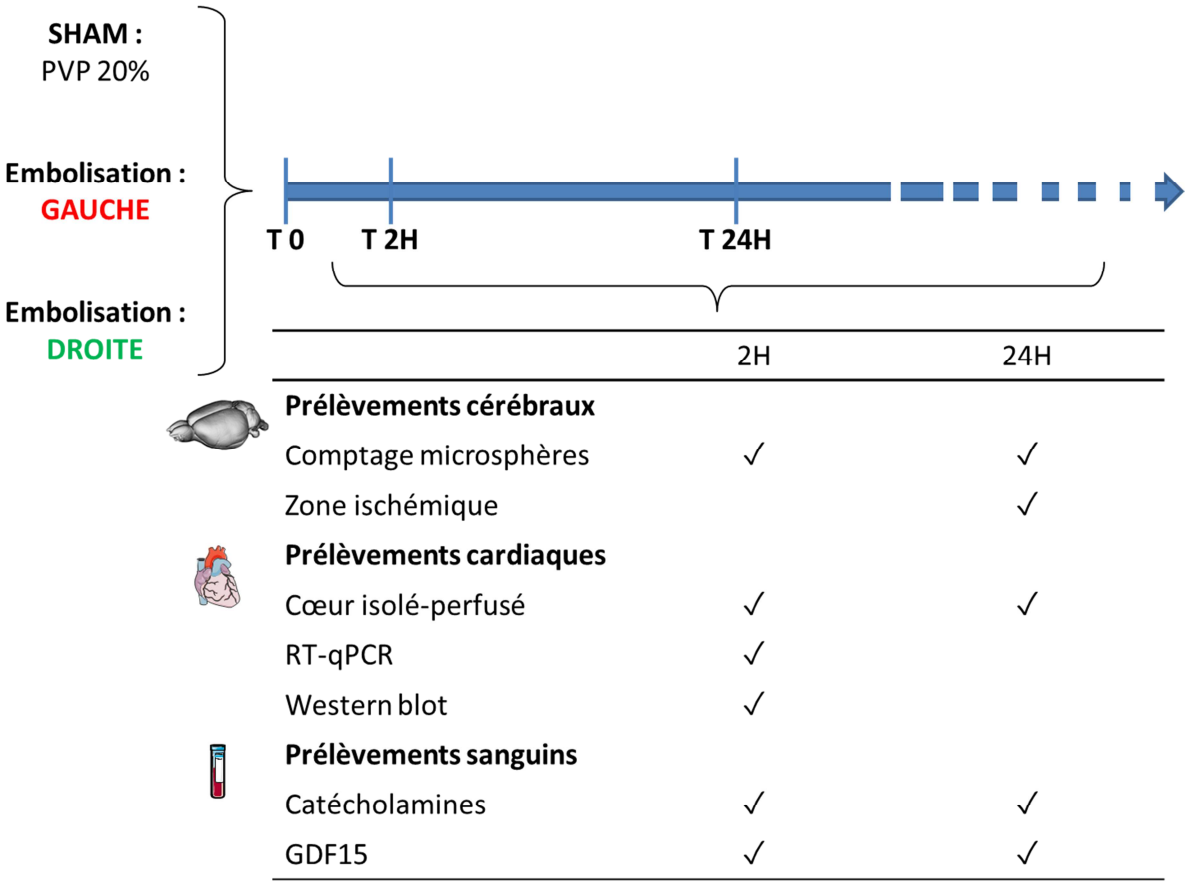
de la Librairie nationale de Médecine (NCBI, USA) et ensuite synthétisées par Invitrogen (Cf Tableau I). L'expression génique cible était normalisée grâce à l'expression génique de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Chaque échantillon était mesuré en triplicate et l'intégrité des points de données a été examinée par analyse du graphique d'amplification. L'expression relative de l'ARNm a été calculée à l'aide de l'équation suivante: $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tableau I : Amorces utilisées pour l'amplification des ARNm dans les tissus de rat

Gène	Amorce	Séquence de l'amorce	Taille (pb)
eNOS	Sens	5'-CCGGACAACCTCATCACTGTGG-3'	156
	Anti-Sens	5'-CCTCTGGCCTTCTGCTCATTT-3'	
GPX1	Sens	5'-CTTGGTGATGGCTGGCTG-3'	114
	Anti-Sens	5'-ACCAGCGCCCATCTGAG-3'	
Cat	Sens	5'-TACTACCCCAACAGCTTCAGC-3'	138
	Anti-Sens	5'-CTTCGTATAGAATGTCCGCAC-3'	
ADRB1	Sens	5'-AAGACACTGGGCATCATCA-3'	113
	Anti-Sens	5'-AAGACGAAGAGGCGATCC-3'	
JAK2	Sens	5'-AGAAGACAGGAAAACAGGGA -3'	124
	Anti-Sens	5'-TTCAATGCACTCAGGTGGTA -3'	
STAT3	Sens	5'-TACCATTGACCTGCCGAT-3'	100
	Anti-Sens	5'-CTCAAACTGCCCTCCTGC-3'	
GDF15	Sens	5'-CGAGAGGACTCGAACTCAGA-3'	71
	Anti-Sens	5'- CCCAATCTCACCTCTGGACT-3'	
GAPDH	Sens	5'-CTACCCACGGCAAGTTCAAC-3'	148
	Anti-Sens	5'-CCAGTAGACTCCACGACATAC-3'	

IX. Western blot

Le tissu était homogénéisé dans 10 volumes de tampon RIPA (radio-immunoprecipitation assay), centrifugé à 10 000 g pendant 15 minutes à 4°C et la concentration protéique était déterminée dans le surnageant par la méthode de Lowry. Des quantités égales de protéines du surnageant ont été séparées par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrilamide dans des conditions dénaturantes et transférées sur membrane de polyvinylidene difluoride de 0,45 µm. Après blocage des sites non-spécifiques, les membranes étaient incubées pendant 3 h avec des anticorps primaires dirigés contre eNOS (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, USA), phospho-eNOS^{Ser1177} (peNOS, 1:1000, Cell Signaling Technology), GPX1 (1:10000, Abcam, Cambridge, UK), CAT (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), ADRB1 (1:200, Bioss Antibodies), JAK2 (1:1000, Abcam), STAT3 (1:2000, Cell Signaling Technology), phospho-STAT3^{Ser727} (pSTAT3, 1:1000, Cell Signaling Technology), GDF15 (1 :1000, Abcam, Cambridge, UK), HPRT (1 :10000, Abcam, Cambridge, UK) ou GAPDH (as internal control, 1:1000, Cell Signaling Technology). Ensuite, les membranes étaient incubées pendant 1h 30 avec des anticorps anti-IgG liés à la peroxydase de raifort anti-souris (1:50000, Jackson ImmunoResearch, West grove, USA) ou anti-lapin (1:1000, Cell Signaling Technology). Les bandes ont été visualisées en utilisant un réactif de détection chimioluminescent, Clarity Western ECL (Bio-Rad, Hercules, USA). Les tâches chimioluminescentes étaient d'abord détectées par l'imageur ChemiDoc XRS+ (BioRad) et les outils d'analyse du logiciel Image Lab software version 5.2.1 (Bio-Rad) ont été utilisés pour analyser semi-quantitativement les bandes.



	2H	24H
Prélèvements cérébraux		
Comptage microsphères	✓	✓
Zone ischémique		✓
Prélèvements cardiaques		
Cœur isolé-perfusé	✓	✓
RT-qPCR	✓	
Western blot	✓	
Prélèvements sanguins		
Catécholamines	✓	✓
GDF15	✓	✓

Figure 9 : Frise chronologique des différentes expérimentations

X. Statistiques

Les données sont présentées sous forme de moyennes±écart standard à la moyenne. Les différences statistiquement significatives pour les valeurs moyennes de trois groupes ont été testées par analyse de variance (ANOVA) suivie du test de Tukey. Une ANOVA sur mesures répétées suivie d'une analyse post-hoc de Tukey a été appliquée pour des données consistant en des observations répétées à des instants successifs. La différence était considérée comme significative lorsque $p < 0,05$. Les données ont été analysées avec le logiciel SigmaPlot version 12.5.

RESULTATS

I. L'embolisation cérébrale par des microsphères induit des infarctus cérébraux et des déficits neurologiques importants

Des scores de déficits neurologiques sévères ont été observés dans les groupes de rats ayant subi un AVC 2 h, 24 h et 7 jours après l'embolisation (Figure 10). Deux heures après embolisation cérébrale, 397±33 microsphères étaient retrouvées dans l'hémisphère homolatéral et 54±5 microsphères dans l'hémisphère controlatéral (Figure 11A). La coloration au TTC a été réalisée sur les tranches cérébrales, 24 h après l'embolisation car à 2 h, dans les zones ischémiées, les cellules n'étaient pas encore nécrosées ce qui ne permettait pas d'avoir de différence de coloration avec le TTC. Les rats du groupe Sham présentaient une coloration rouge uniforme des zones viables contenant des cellules (matière grise) et une coloration blanche des fibres acellulaires (matière blanche : corps calleux, capsule interne). Chez les rats embolisés, les zones nécrotiques blanches étaient seulement observées au niveau de l'hémisphère homolatéral (Figure 12). Les volumes d'AVC étaient de 31±4% pour les AVC gauches et de 29±4% pour les AVC droits 24 h après embolisation (Figure 11B).

II. L'embolisation cérébrale conduit à des dysfonctions cardiaques in vivo et ex vivo

La fonction cardiovasculaire a été initialement évaluée *in vivo*. Il n'y avait pas de différence significative entre les 3 groupes concernant la pression artérielle systolique (Figure 13A). Nous avons par contre observé une détérioration précoce (dès 2 h) et persistante (jusqu'à 7 jours) de la fraction de raccourcissement du VG, tout au long des 7 jours de la période de suivi, dans les groupes AVC versus le groupe Sham (Figure 13B). Ensuite, de manière à étudier la fonction cardiaque post-AVC indépendamment de tous les facteurs circulants ou nerveux, les cœurs des rats ont été isolés et perfusés *ex vivo* et les paramètres fonctionnels cardiaques ont été appréciés. 2 heures après embolisation cérébrale, la Pdev basale était significativement plus faible dans les 2 groupes AVC par rapport au groupe Sham : 106,6±4,4 mmHg [gauche], 106,2±4,7 mmHg [droit] *vs.* 129,9±2,7 mmHg [sham] (Figure 13C). Cette différence était également observée 24 h après la chirurgie : 91,8±3,7 mmHg [gauche], 104,0±5,3 mmHg [droit] *vs* 120,9±5,1 mmHg [sham] (Figure 13D). Les autres paramètres fonctionnels ne présentaient pas de différences significatives pour les 3 groupes durant la période de perfusion basale.

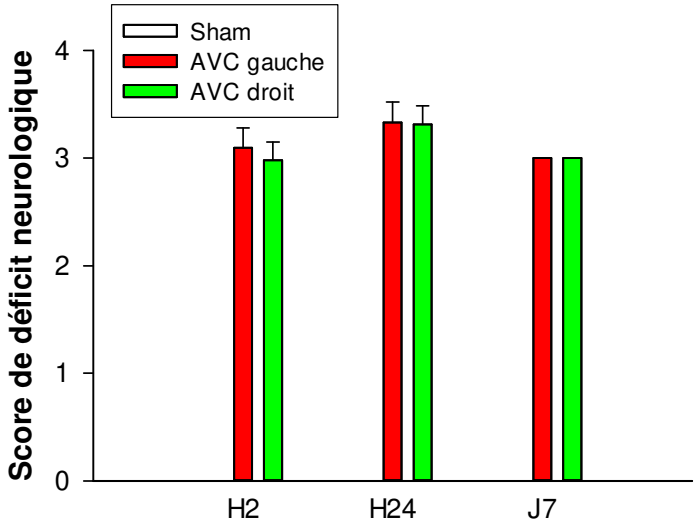


Figure 10 : Impact de l'embolisation cérébrale. Score de déficit neurologique à 2 h, 24 h et 7 jours.

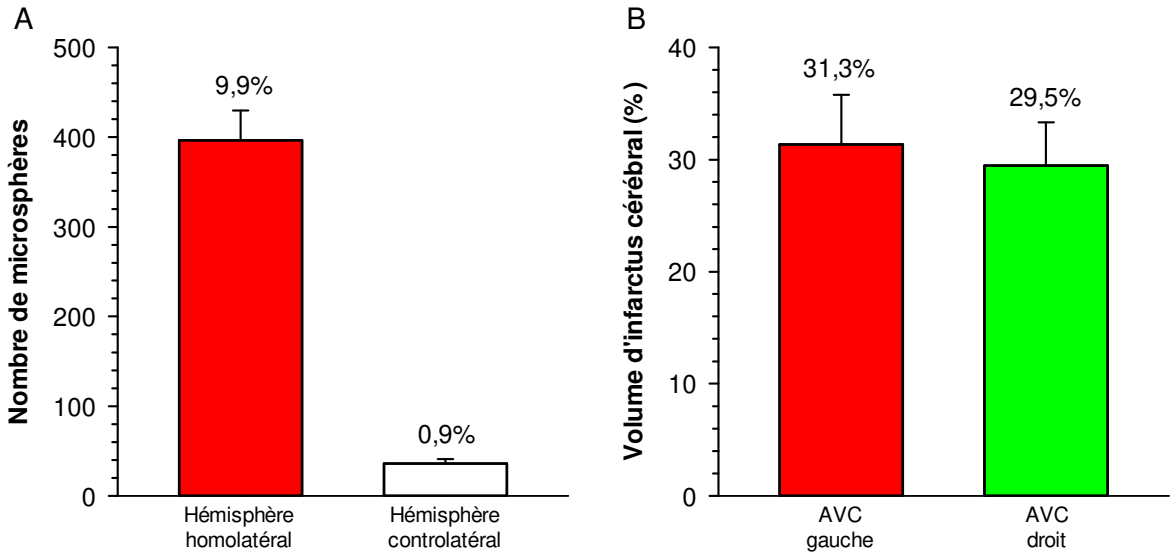


Figure 11 : Impact de l'embolisation cérébrale. A : Nombre calculé de microsphères après embolisation cérébrale (n=126). B : Volume d'infarctus cérébral (% de l'aire cérébrale totale) (n=19).

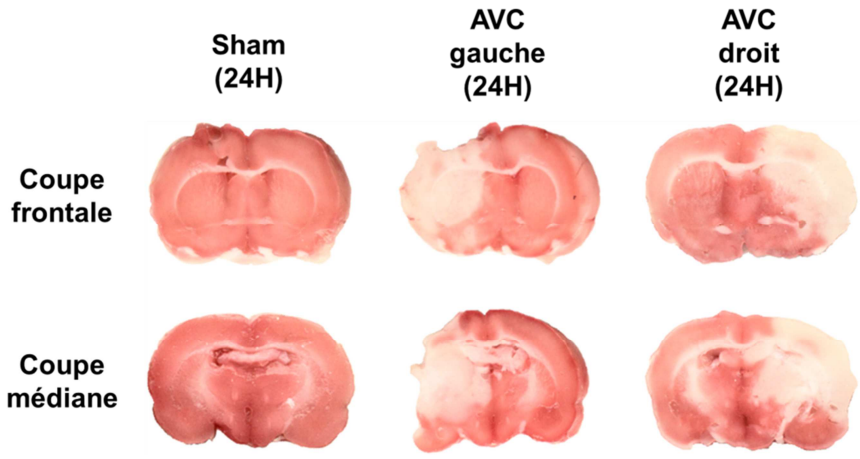


Figure 12 : Impact de l'embolisation cérébrale. Volume d'infarctus cérébral.

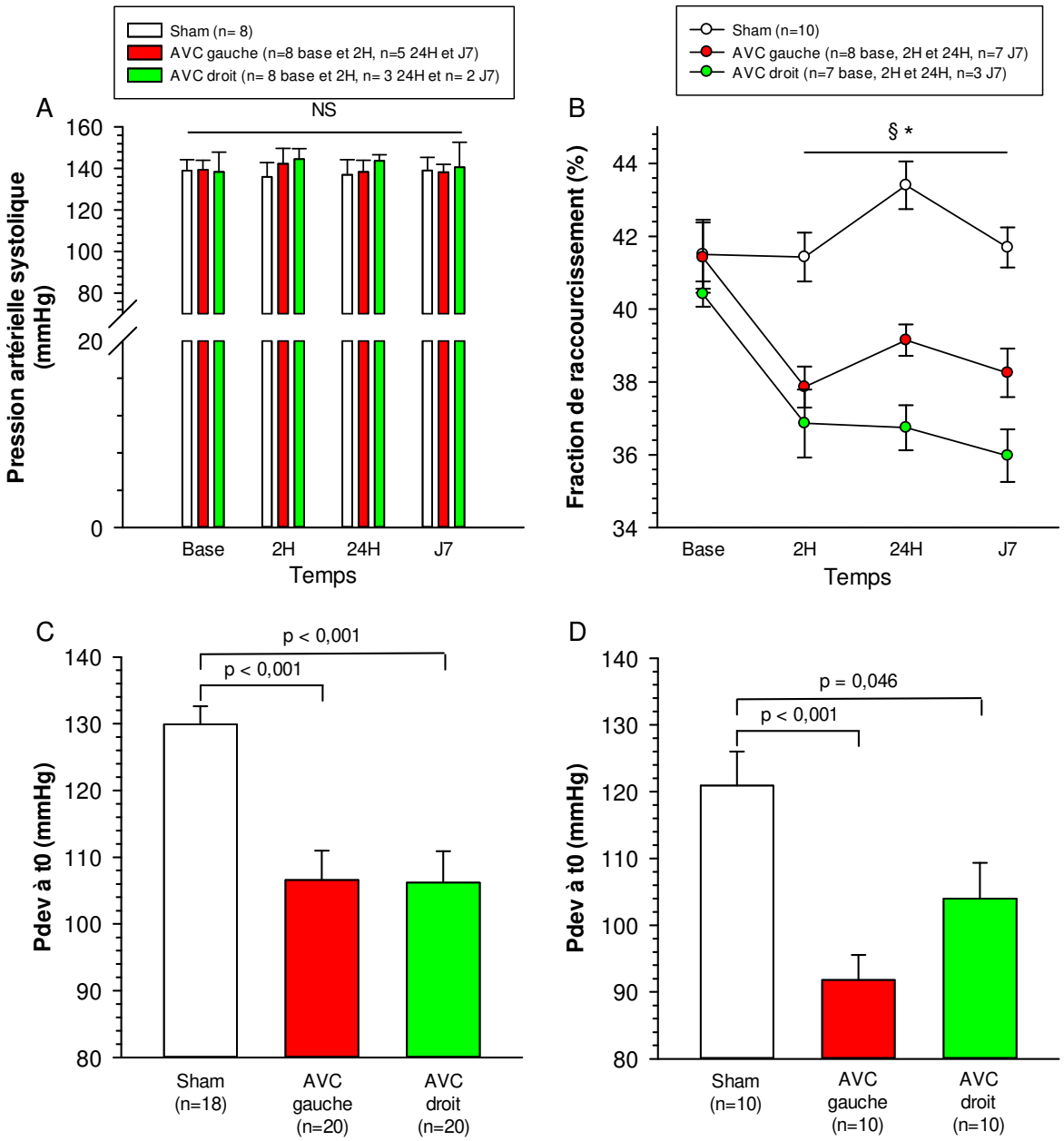


Figure 13 : Fonction cardiovasculaire *in vivo* et *ex vivo*. A : Pression artérielle systolique après embolisation cérébrale à gauche ou à droite. B : Evolution de la fraction de raccourcissement du VG. * : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et les Sham et § : p<0,05 différence significative entre les AVC droits et les Sham. C : Pdev du cœur isolé perfusé de rat 2 h après embolisation cérébrale gauche ou droite pendant la première minute de perfusion basale (t0). D : Pdev du cœur isolé perfusé de rat 24 h après embolisation cérébrale gauche ou droite pendant la première minute de perfusion basale (t0).

III. L'embolisation cérébrale augmente la vulnérabilité cardiaque à l'ischémie-reperfusion ex vivo

Afin d'évaluer comment un AVC ischémique préalable pouvait influencer la vulnérabilité cardiaque aux lésions d'ischémie-reperfusion, nous avons exposé les cœurs isolés, 2 h après une embolisation cérébrale, à 30 minutes d'ischémie globale totale, ce qui est généralement considéré comme étant une ischémie partiellement irréversible. La reperfusion

conduisait à une récupération limitée des paramètres fonctionnels cardiaques initiaux. Dans le groupe AVC droit, la récupération post-ischémique du DC était significativement plus faible que celle du groupe Sham : 8,3±0,1 mL/min *vs* 10,6±0,2 mL/min respectivement, p<0,05 (Figure 14A). Durant l'ischémie, les battements cardiaques cessaient mais une augmentation de la Pdia était observée dans tous les groupes, due à la contracture ischémique.

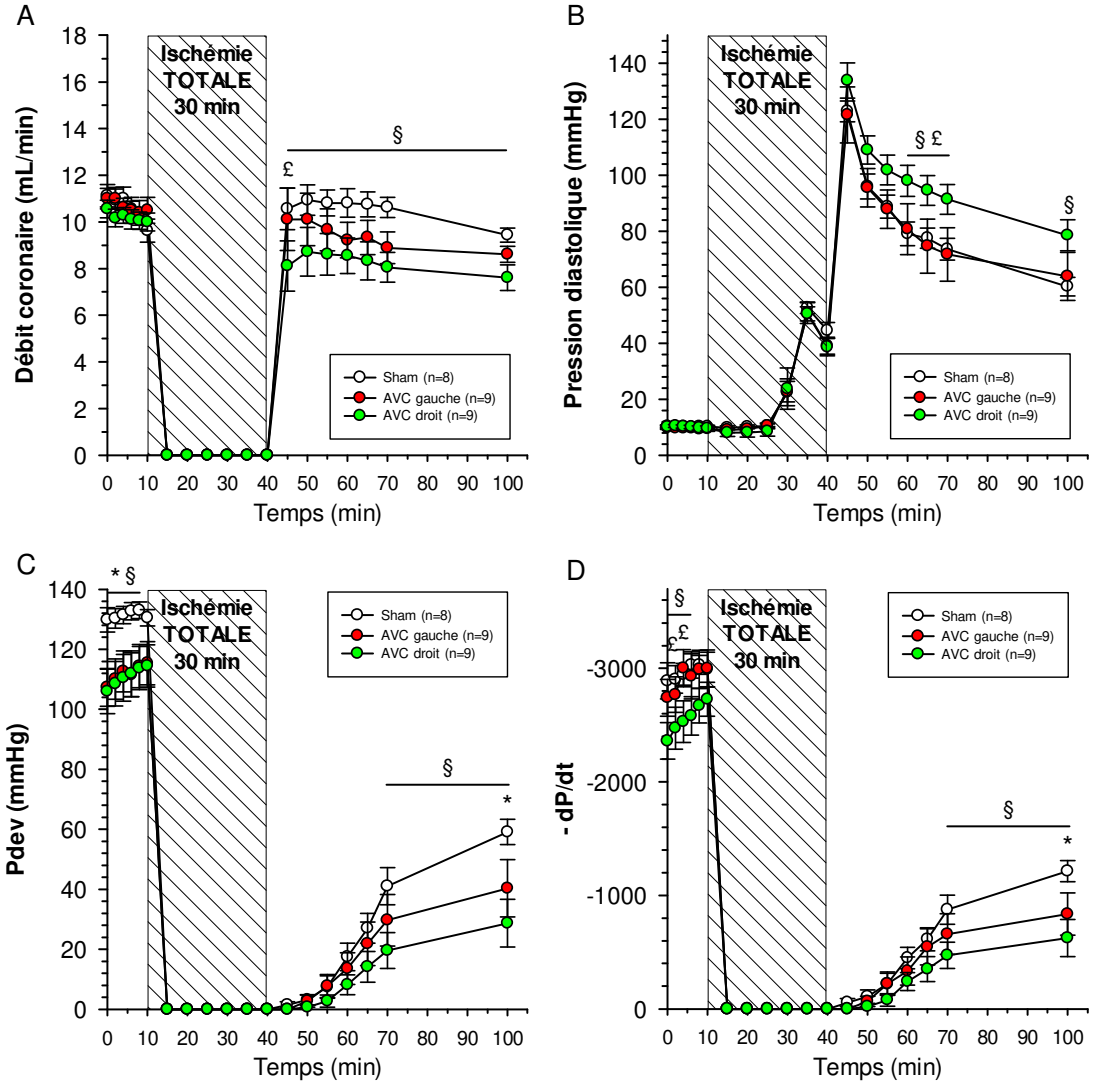


Figure 14 : Evolution des paramètres fonctionnels des cœurs isolés perfusés, 2 h après embolisation ou non. A : Débit coronaire. B : Pdia. C : Pdev. D : -dP/dt. Les cœurs ont été perfusés pendant 10 minutes puis ont subi une ischémie globale totale de 30 minutes suivie d'une heure de reperfusion. * : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et les Sham, § : p<0,05 différence significative entre les AVC droits et les Sham et £ : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et droits au même temps de mesure en utilisant une ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées.

La reperfusion a entrainé une augmentation brusque et brutale de la Pdia, liée à une contracture post-ischémique qui était plus importante dans le groupe AVC droit que dans le groupe Sham à partir de la 20ème minute de reperfusion : 90,6±4,2 mmHg vs 72,6±4,3 mmHg respectivement, p<0,05 (Figure 14B). Après 30 minutes d'ischémie globale totale, la reperfusion n'avait conduit qu'à une récupération partielle de la contractilité du myocarde

dans tous les groupes, avec un retour identique à un rythme sinusal altéré (données non présentées). Cependant, les Pdev et -dP/dt étaient significativement plus faibles que ce soit dans le groupe AVC gauche ou dans le groupe AVC droit comparé au groupe Sham après 60 minutes de reperfusion (Figures 14C et 14D).

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons évalué la vulnérabilité du myocarde à une lésion d'ischémie-reperfusion plus réversible et donc nous avons soumis les cœurs isolés à une ischémie globale totale de 20 minutes suivie d'une reperfusion.

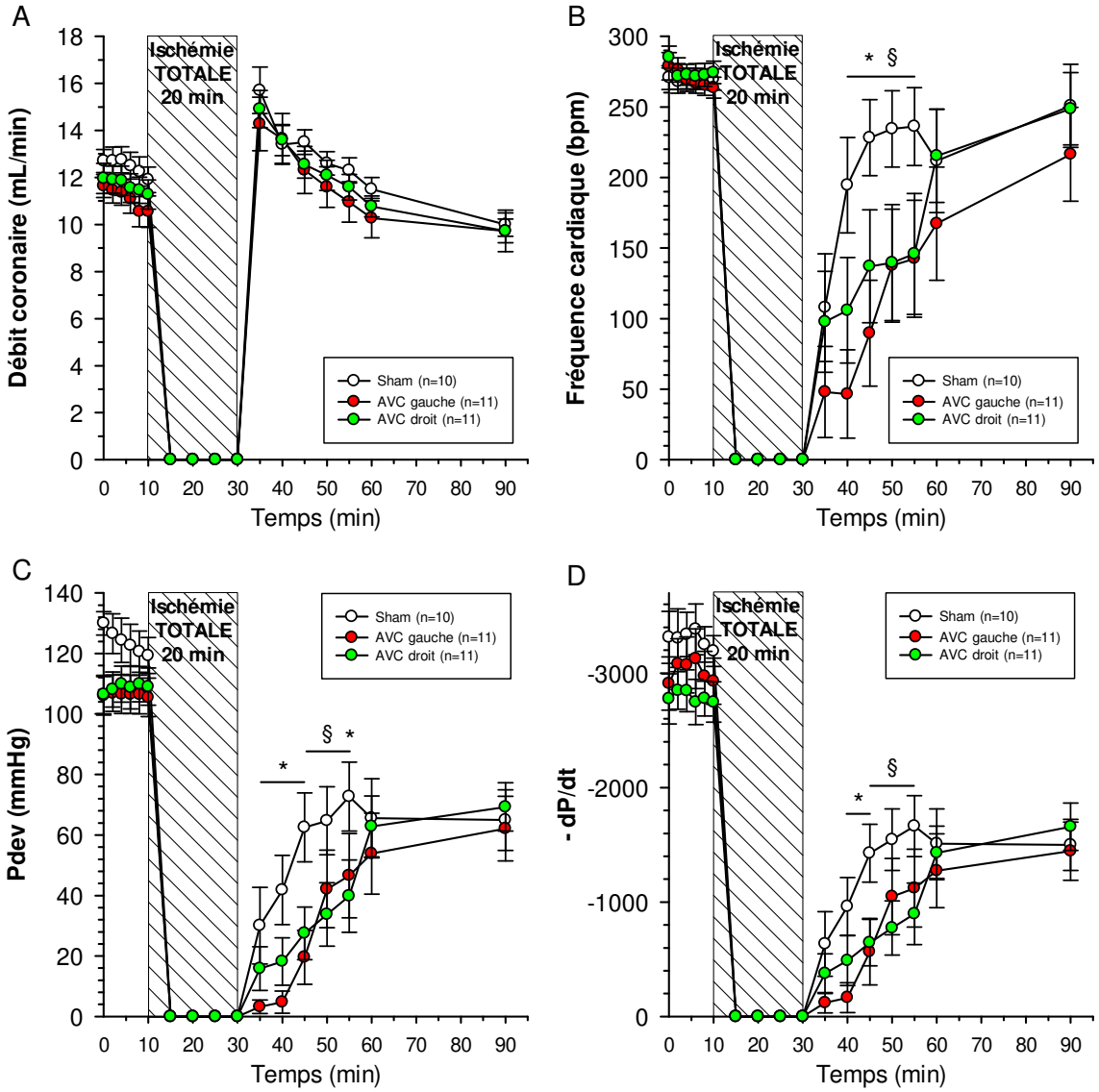


Figure 15 : Evolution des paramètres fonctionnels des cœurs isolés perfusés, 2 h après embolisation ou non. A : Débit coronaire. B : Fréquence cardiaque. C : Pdev. D : -dP/dt. Les cœurs ont été perfusés pendant 10 minutes puis ont subi une ischémie globale totale de 20 minutes suivie d'une heure de reperfusion. * : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et les Sham et § : p<0,05 différence significative entre les AVC droits au même temps de mesure en utilisant une ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées.

Dans ces conditions, tous les groupes ont récupéré totalement leur DC avec une hyperémie durant les 20 premières minutes de reperfusion (Figure 15A). Néanmoins, en ce qui

concernait la contractilité cardiaque, la FC, la Pdev et la -dP/dt, ces paramètres présentaient une récupération plus lente au cours de la reperfusion dans les groupes AVC par rapport au groupe Sham (Figures 15B, 15C et 15D).

La récupération myocardique après ischémie-reperfusion a aussi été évaluée 24 h après embolisation cérébrale ou chirurgie Sham (Figure 16). Cependant, de façon inattendue, une récupération presque totale de tous les paramètres fonctionnels a été observée dans le groupe Sham comparé à des cœurs soumis à la même durée d'ischémie cardiaque et prélevés 2 h après une embolisation cérébrale sous anesthésie à l'isoflurane. Dans ces conditions très différentes, la récupération post-ischémique des paramètres fonctionnels du myocarde ne différait pas d'un groupe à l'autre, excepté à certains points pour la fréquence cardiaque dans le groupe AVC gauche.

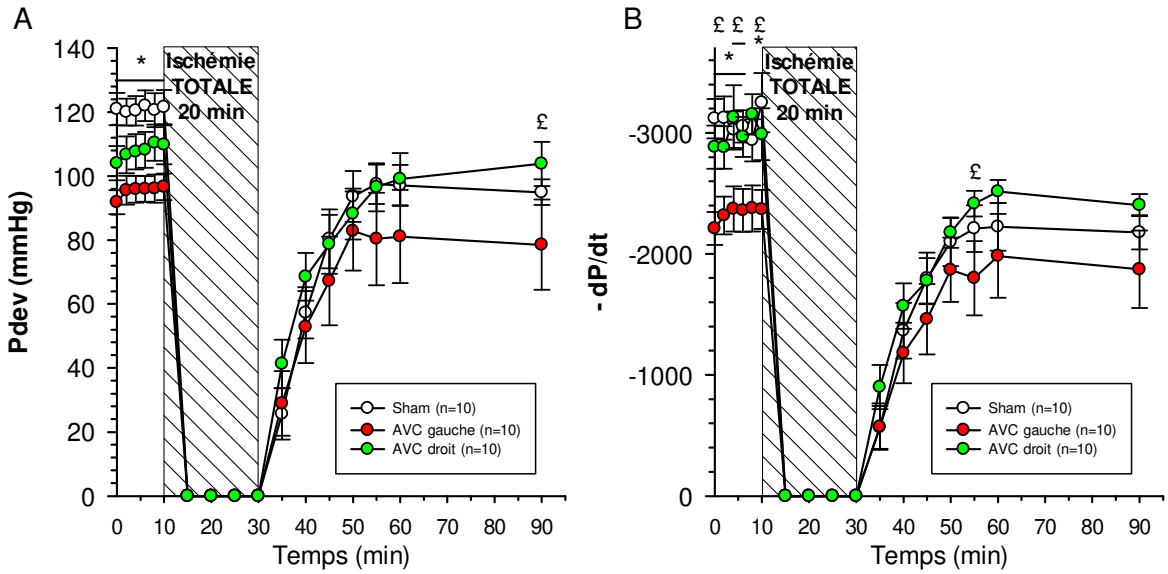


Figure 16 : Evolution des paramètres fonctionnels des cœurs isolés perfusés, 24 h après embolisation ou non. A : Pdev. B : -dP/dt. Les cœurs ont été perfusés pendant 10 minutes puis ont subi une ischémie globale totale de 20 minutes suivie d'une heure de reperfusion. * : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et les Sham et £ : p<0,05 différence significative entre les AVC gauches et droits au même temps de mesure en utilisant une ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées.

IV. Les dysfonctions cardiaques après embolisation cérébrale sont associées à une augmentation des taux de catécholamines et de GDF15 dans la circulation

Afin d'évaluer l'activation du SNA, nous avons mesuré les concentrations plasmatiques de catécholamines. 2 h et 24 h après embolisation. Dans les 2 groupes AVC, il y

avait une augmentation significative des taux plasmatiques d'Ad et de NA par rapport au groupe Sham (Figures 17A et 17B).

Le GDF15, un marqueur de plusieurs situations physiopathologiques associées aux maladies cardiovasculaires, était présent à des taux élevés au niveau sanguin 2 h après embolisation cérébrale dans les groupes AVC par rapport au groupe Sham : 185,3±13,3 ng/L [gauche], 137,0±10,4 ng/L [droit] *vs.* 96,7±4,3 ng/L [sham] (Figure 17C). Cette différence était toujours observée 24 h post-chirurgie : 203,9±20,5 ng/L [gauche], 157,4±7,6 ng/L [droit] *vs.* 113,0±8,3 ng/L [sham] (Figure 17D).

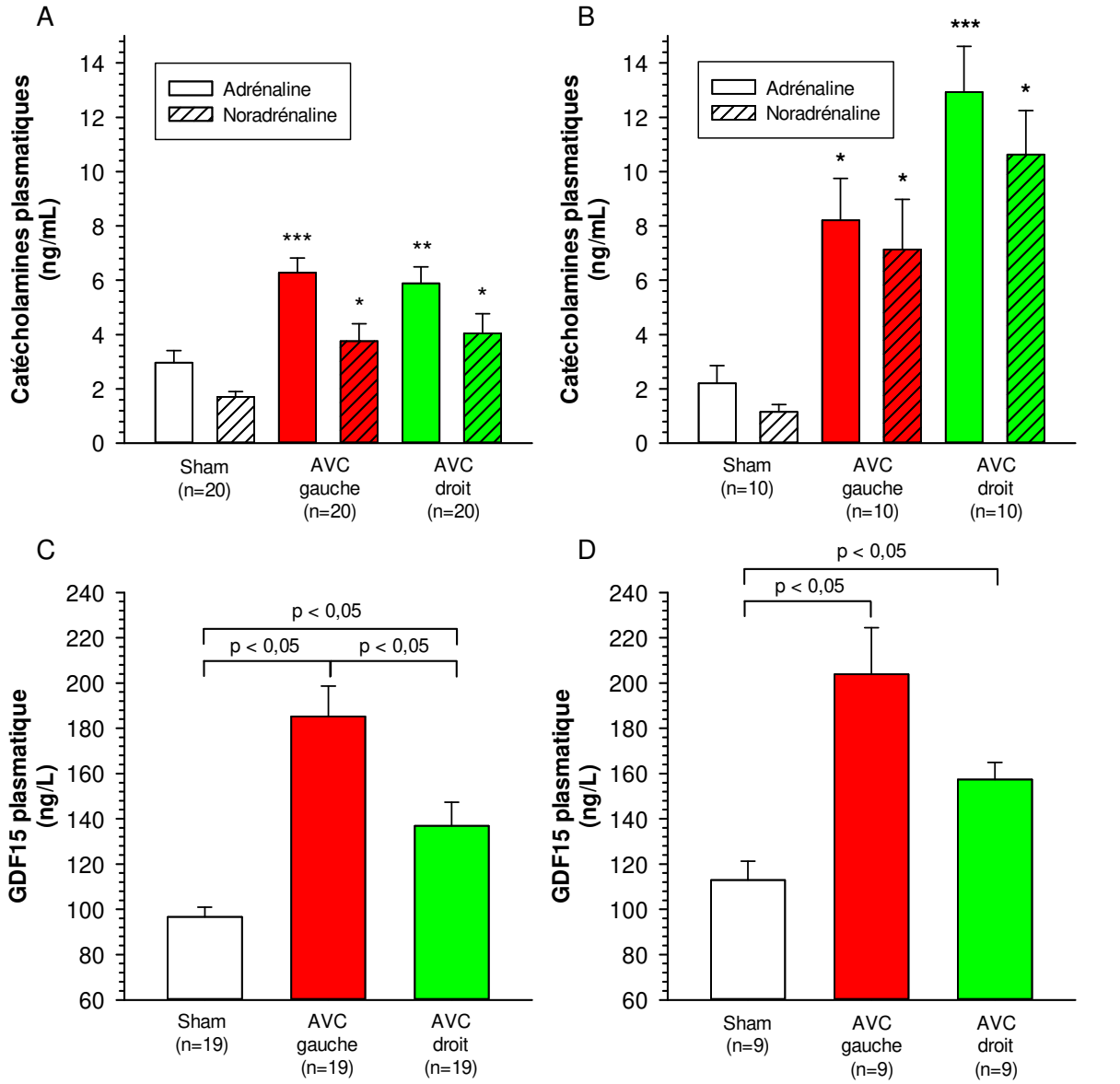


Figure 17 : Concentrations plasmatiques de catécholamines et de GDF15. A : Taux de catécholamines 2 h post-embolisation. B : Taux de catécholamines 24 h post-embolisation. *: p<0.05 versus sham group, **: p<0.01 versus sham group and ***: p<0.001 versus sham group. C : Taux de GDF15 2 h post-embolisation. D : Taux de GDF15 24 h post-embolisation.

V. L'embolisation cérébrale altère la signalisation nitro-oxydante dans le cœur

Pour examiner l'impact potentiel de l'AVC sur la signalisation cellulaire du myocarde, les gènes et protéines impliqués dans le stress nitro-oxydant ont été analysés au niveau cardiaque.

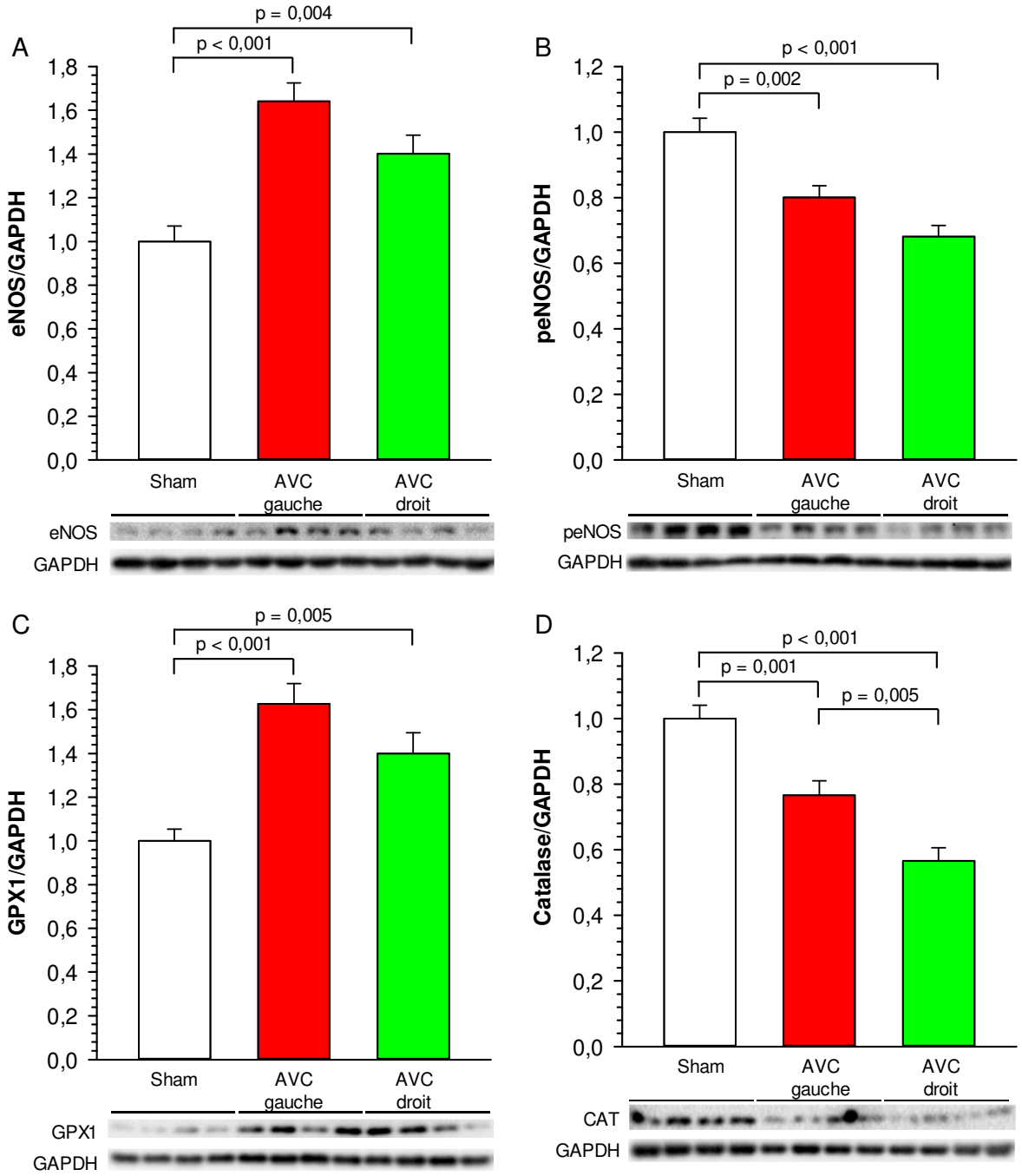


Figure 18 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression protéique au niveau cardiaque d'eNOS (A), de peNOS (B), de GPX1 (C) et de CAT (D) déterminée par western blot 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à la GAPDH. n=12 par groupe.

Les embolisations cérébrales gauches et droites augmentaient significativement l'expression cardiaque d'ARNm et de protéines d'eNOS et de GPX1 et diminuaient l'expression protéique de peNOS. L'expression protéique de la CAT était diminuée dans les cœurs des rats ayant subi un AVC à gauche ou à droite, sans modifications des taux d'ARNm (Figures 18 et 19).

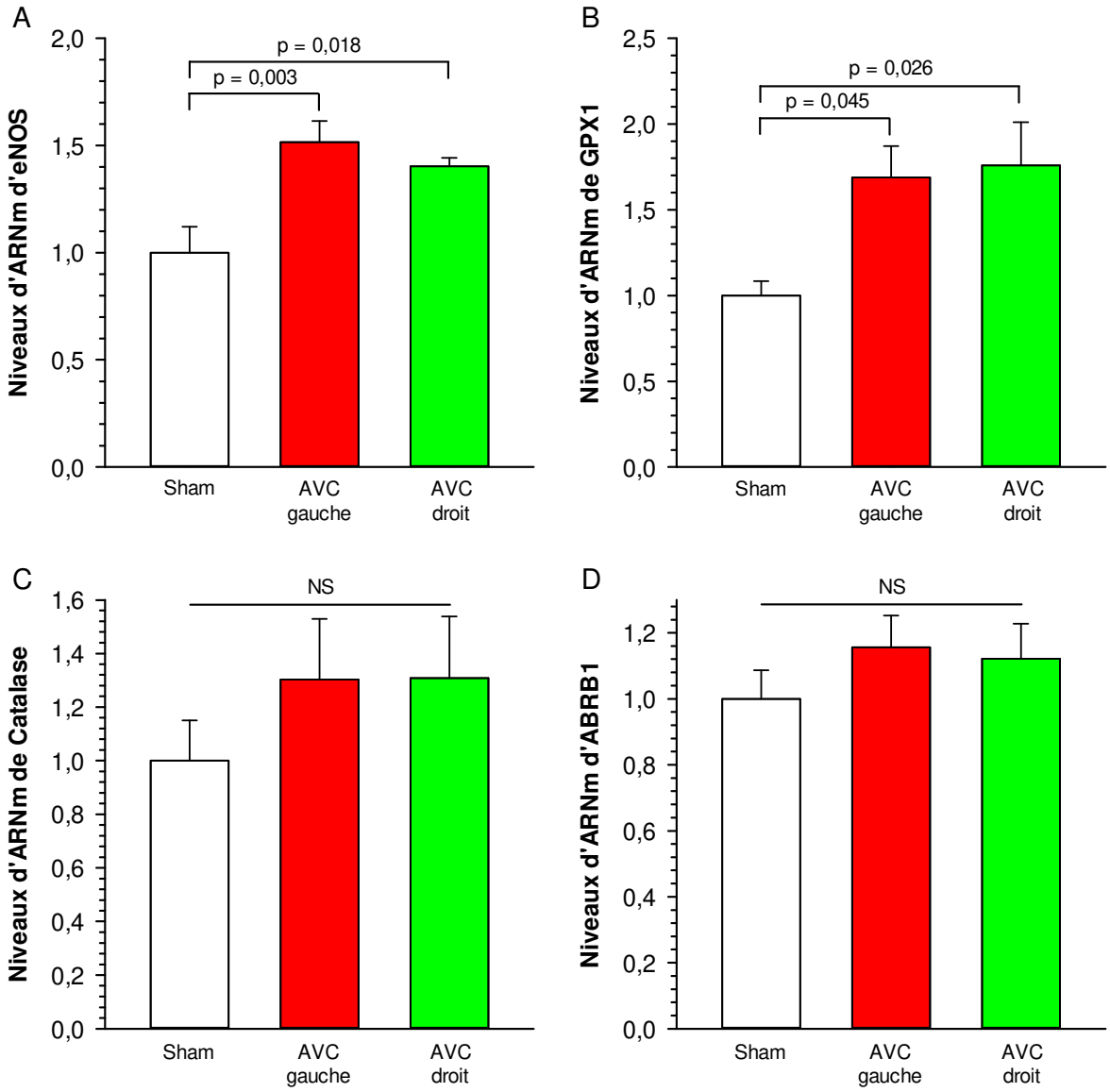


Figure 19 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression génique au niveau cardiaque d'eNOS (A), de GPX1 (B), de CAT (C) et d'ADRB1 (D) déterminée par PCR 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à la GAPDH. n=7 par groupe.

VI. L'embolisation cérébrale altère l'expression myocardique d'ADRB1 et de la voie de cardioprotection SAFE

L'expression du principal récepteur adrénergique cardiaque, ADRB1, a été étudiée afin d'évaluer le mécanisme potentiel de dysfonctionnement contractile du myocarde induit par un AVC, malgré l'augmentation des taux circulants d'Ad et de NA. Les résultats ont montré une diminution significative de l'expression protéique d'ADRB1 dans le cœur des rats ayant subi un AVC 2 h auparavant, sans modification de l'expression génique (Figures 19D et 20A).

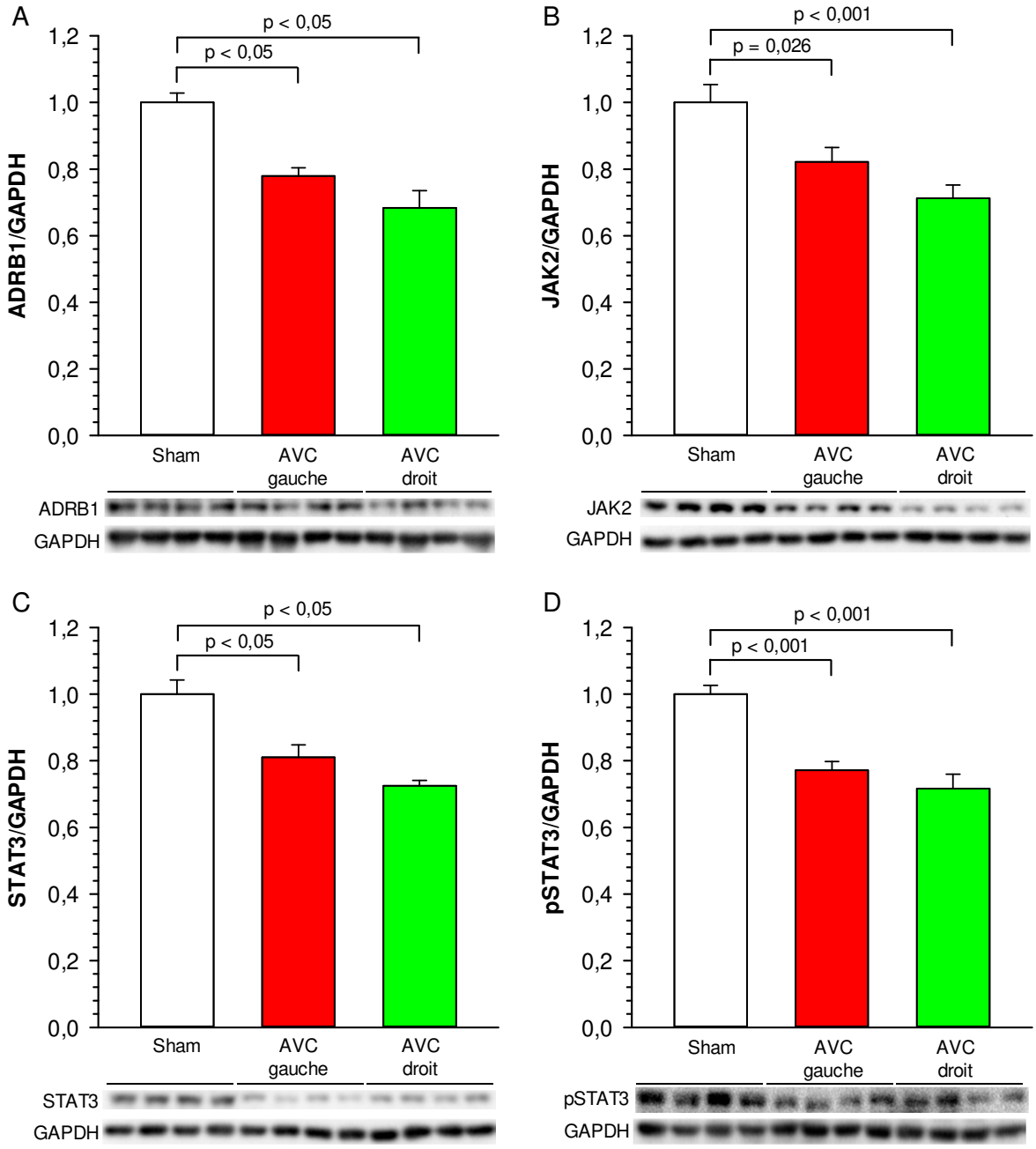


Figure 20 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression protéique au niveau cardiaque d'ADRB1 (A), de JAK2 (B), de STAT3 (C) et de pSTAT3 (D) déterminée par western blot 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à la GAPDH. n=12 par groupe.

Afin de comprendre comment un infarctus cérébral antérieur pouvait aggraver la récupération fonctionnelle du myocarde après une lésion d'ischémie cardiaque réversible ou irréversible, les différents intervenants de la voie de signalisation de cardioprotection SAFE ont été évalués au niveau cardiaque. Les résultats ont montré qu'une embolisation cérébrale, qu'elle soit à gauche ou à droite, diminuait de manière significative l'expression protéique de JAK2, STAT3 et pSTAT3 à court terme au niveau cardiaque (Figure 20). Ces modifications protéiques de la voie SAFE ne sont pas retrouvées au niveau génique et à l'inverse,

l'expression génique de STAT3 est même augmentée dans le groupe AVC gauche par rapport aux rats témoins (Figure 21). Les résultats présentés jusqu'ici ont fait l'objet d'une publication dans Stroke (cf Annexes).

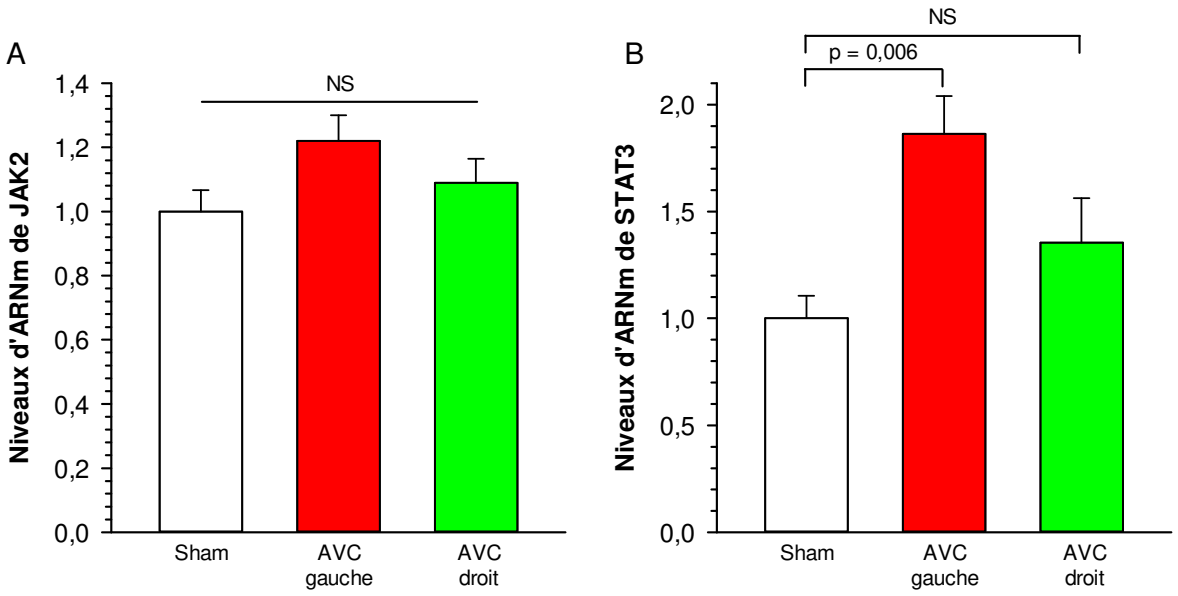


Figure 21 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression génique au niveau cardiaque de JAK2 (A) et de STAT3 (B) déterminée par PCR 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à la GAPDH. n=7 par groupe.

VII. L'embolisation cérébrale active l'expression du GDF15 au niveau cérébral et cardiaque.

Afin de comprendre l'origine de l'augmentation du GDF15 circulant suite à une ischémie cérébrale, l'expression génique et protéique du GDF15 a été évaluée au niveau de différents tissus après embolisation droite ou gauche. Les RT-qPCR ont révélé une augmentation intense de l'expression de l'ARNm du GDF15 au niveau du cervelet (d'environ 10 fois) et du cortex homolatéral (de 12 à 17 fois) dans les groupes AVC par rapport au groupe Sham. Une augmentation plus modérée (mais néanmoins de l'ordre de 3 fois) a été observée au niveau du cortex controlatéral, mais seulement chez les AVC droits (Figure 22). Les autres tissus (cœur, poumons, foie, …) ne montraient aucune modification de l'expression génique du GDF15 entre les groupes Sham et AVC. Au niveau protéique, cette augmentation d'expression (+40 à 60%) a bien été retrouvée au niveau du cortex cérébral homolatéral, pour les AVC par rapport aux rats Sham mais uniquement pour la forme proGDF15, et pas la forme mature du GDF15. En revanche, de manière particulièrement intéressante, au niveau

cardiaque nous avons constaté une augmentation non seulement de l'expression du proGDF15 (+50%) mais aussi de la forme mature du GDF15 (+80%) (Figure 23).

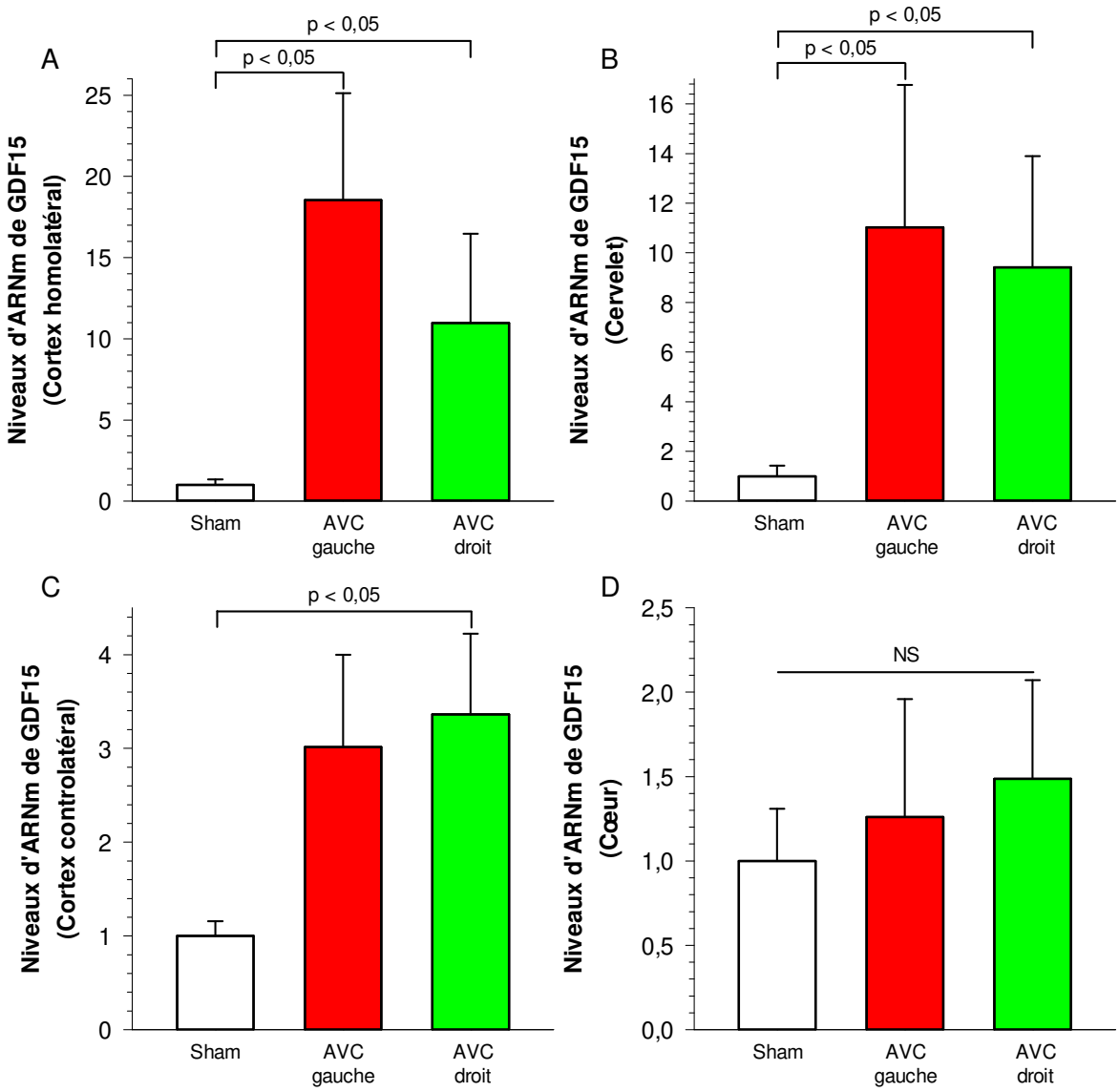


Figure 22 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression génique de GDF15 au niveau du cortex homolatéral (A), du cervelet (B), du cortex controlatéral (C) et du cœur (D) déterminée par PCR 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à la GAPDH. n=8 par groupe.

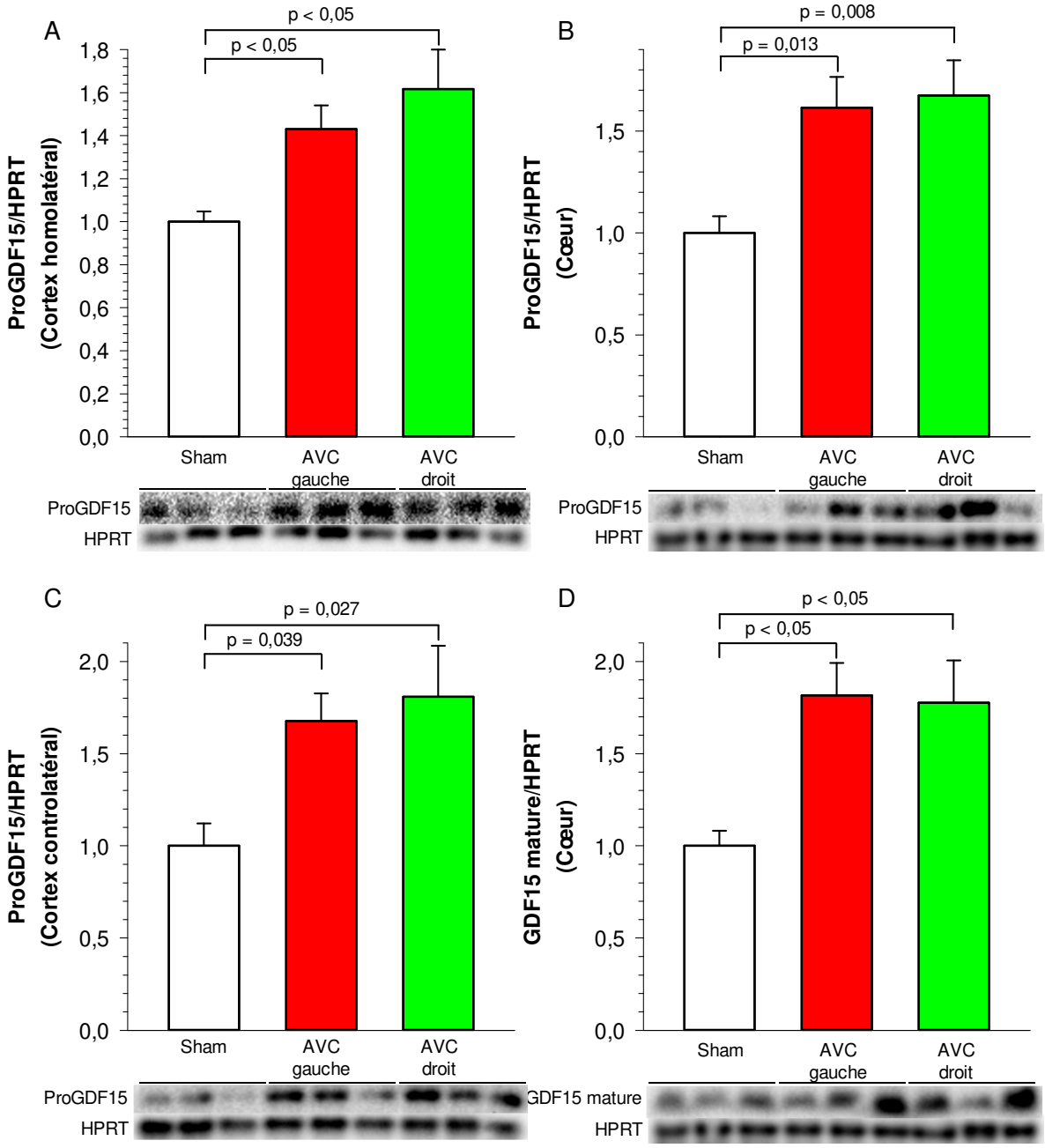


Figure 23 : Impact de l'embolisation cérébrale sur l'expression protéique du ProGDF15 au niveau du cortex homolatéral (A), du cœur (B), du cortex controlatéral (C) et du GDF15 mature au niveau du cœur (D) déterminée par western blot 2 h après embolisation cérébrale. Les données sont normalisées à l'HPRT. n=9-10 par groupe sauf pour le cortex controlatéral ou n=5 pour les Sham, 6 pour les AVC gauches et 4 pour les AVC droits.

DISCUSSION

Nous avons montré pour la première fois qu'une ischémie cérébrale préalable chez le rat pouvait ultérieurement augmenter la vulnérabilité du cœur aux lésions d'ischémie-reperfusion et altérer, au niveau génique et protéique, des voies de signalisation cellulaire généralement considérées comme cardioprotectrices. Nous avons aussi mis en évidence un changement dans la fonction contractile du myocarde tant *in vivo* qu'*ex vivo*. Les altérations observées sur cœur isolé s'exercent dans une situation où ni les facteurs circulants ni les composantes du système nerveux ne peuvent influencer la fonction cardiaque, ce qui suggère que l'AVC entrainerait un « marquage » persistant du tissu cardiaque. L'hyperactivité sympathique avec l'augmentation des catécholamines, alors qu'il est constaté une régulation à la baisse des récepteurs β1-adrénergiques au niveau cardiaque, pourrait être considérée comme un des mécanismes potentiels des effets cardiovasculaires délétères médiés par l'AVC.

Le modèle d'embolisation cérébrale avec l'injection de microsphères dans l'artère carotide interne a été choisi dans notre étude car il permettait de reproduire certains aspects des AVC cardio-emboliques ou d'origine carotidienne (Hossmann 1998). Une des limites de ce modèle est que les microsphères sont distribuées de manière aléatoire dans tout le cerveau et produisent de multiples infarctus disséminés, contrairement à la MCAO conventionnelle avec laquelle le volume de l'infarctus et la localisation dans des zones cérébrales précises peuvent être évalués. En effet, il pourrait être intéressant d'induire des dommages dans des zones définies du cerveau comme le cortex insulaire, dont on sait que l'activation entraine des conséquences cardiovasculaires (Oppenheimer and Cechetto 2016). En outre, le modèle d'embolisation avec microsphères induit une occlusion non-réversible de l'artère et engendre la création de petits infarctus cérébraux permanents (Bere et al. 2014), alors que chez les patients ayant subi un AVC, la reperfusion peut survenir spontanément ou être induite cliniquement soit par thrombolyse soit par thrombectomie. Cependant, dans le cas d'AVC impliquant les gros vaisseaux, la majorité des patients n'est pas recanalisée (McBride and Zhang 2017), notre modèle peut ainsi s'avérer adapté à l'évaluation préclinique de l'occlusion des gros vaisseaux. En effet, il a été montré, aussi bien au niveau du cœur qu'au niveau du cerveau, qu'il existait un phénomène très important de non-reperfusion des tissus suite aux thérapies salvatrices. Il semble donc nécessaire d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer le pronostic des patients non correctement reperfusés et les processus complexes de ces mécanismes de non-reperfusion (no-reflow) restent donc à mieux élucider (Kloner, King, and Harrington 2018).

Les interactions entre le cœur et le cerveau après un AVC ont été observées dans plusieurs études cliniques et expérimentales. En effet, la FA peut survenir après un AVC ischémique (Kishore et al. 2014) ; dans les 3 mois qui suivent un AVC ischémique, 19% des patients présentent des évènements indésirables cardiaques graves (Prosser et al. 2007) et 6,5% des patients développent un IDM ou une IC aiguë (Micheli et al. 2012). D'un point de vue expérimental, des études *in vivo* ont montré que des lésions cérébrales pouvaient induire des arythmies cardiaques sévères, des dysfonctions myocardiques et même une nécrose des cardiomyocytes (Min et al. 2009) (Sun et al. 2008). Des expériences effectuées *ex vivo* ont montré que des cardiomyocytes isolés des cœurs de rats ayant subi une MCAO droite présentaient une durée de potentiel d'action plus longue (Wang et al. 2009) (Sun et al. 2008). Dans notre étude, l'AVC ischémique impliquait le cortex insulaire ce qui pourrait avoir eu un impact sur la fonction cardiaque *in vivo* (Figure 13). L'une des constations des plus frappantes de notre travail est qu'un AVC ischémique préalable semble non seulement capable de diminuer la contractilité du VG *in vivo* mais aussi *ex vivo* appréciée sur le cœur isolé-perfusé, où ni les facteurs circulants ni le système nerveux n'influent sur la fonction cardio-vasculaire. Cette observation est remarquable car elle suggère que l'ischémie cérébrale a un impact persistant sur le cœur par le biais de signaux qui affectent sa fonction, de manière additionnelle aux effets endocriniens et/ou neuronaux directs. Cet effet « d'imprégnation » du tissu cardiaque par l'ischémie cérébrale, s'observe précocement, dès 2 heures post-embolisation. Nos résultats corroborent ainsi d'autres études qui montrent que la MCAO chez le rat est capable de modifier les courants et les canaux calciques du cardiomyocyte ainsi que d'autres courants ioniques et protéines impliqués dans la mise en œuvre du potentiel d'action (Wang et al. 2009) (Sun et al. 2008) et dans le couplage excitation-contraction du cardiomyocyte (Sun et al. 2010).

Un autre résultat original de ce travail est que l'ischémie cérébrale est capable d'augmenter la vulnérabilité du myocarde aux lésions d'ischémie-reperfusion *ex vivo*. En effet, nous avons trouvé un impact délétère de l'embolisation cérébrale sur la récupération fonctionnelle des cœurs isolés ayant subi une ischémie globale réversible ou irréversible. L'effet délétère de l'AVC est significatif dès 2 heures après la chirurgie mais il est partiellement masqué après un laps de temps plus long (24 h), probablement en raison de l'effet de préconditionnement retardé de l'anesthésie à l'isoflurane combiné à la procédure chirurgicale. L'observation du fait qu'une ischémie cérébrale préalable pourrait aggraver la récupération post-ischémique du myocarde peut être considérée comme paradoxale au vu du concept bien connu de préconditionnement ischémique à distance, selon lequel une ischémie

d'un organe distant pourrait protéger le cœur contre un IDM. Si on extrapole ces données à la situation clinique, ces résultats pourraient poser la question de savoir si les patients victimes d'un AVC ont une vulnérabilité accrue à l'IDM. Nos résultats corroborent ainsi les données qui montrent que les patients qui développent un IDM après un AVC ischémique ont un taux de mortalité supérieur par rapport à la population générale (Micheli et al. 2012). Nous avons également observé que les embolisations cérébrales induites au niveau de l'hémisphère droit seraient plus dommageables pour la fonction cardiaque et pour la récupération fonctionnelle post-ischémique que les AVC touchant l'hémisphère gauche. De fait, il a été démontré aussi bien dans des études chez l'Homme que chez l'animal qu'il existait une latéralisation concernant les effets cardiaques de l'ischémie cérébrale, reliée aux zones distinctes du cortex insulaire gauche ou droit qui contrôlent le système nerveux parasympathique et sympathique, respectivement (Cheung and Hachinski 2004). En effet, plusieurs études ont montré qu'un AVC droit engendrait plus d'effets cardiovasculaires délétères comme des arythmies ou une augmentation des dommages tissulaires myocardiques, indiqués par des taux élevés de troponines (Bieber et al. 2017) (Sun et al. 2008) (Krause et al. 2017). Les lésions cérébro-vasculaires de l'hémisphère droit impliquent une régulation à la baisse de l'activité parasympathique et à l'inverse, une régulation à la hausse du tonus sympathique ayant des conséquences sur la fonction cardiaque (Krause et al. 2017). Cependant, comme précisé précédemment, le modèle d'embolisation cérébrale avec des microsphères utilisé dans ce travail ne permet pas d'étudier l'impact de la revascularisation sur les effets cardiaques induits par l'AVC. Des études futures avec un modèle permettant une reperfusion et qui offrirait l'opportunité de créer des dommages dans une région cérébrale spécifique et d'imposer différentes durées d'AVC, comme le modèle MCAO, sont prévues, afin de déterminer 1/ si la vulnérabilité myocardique à l'ischémie suite à un AVC ischémique persiste quand le cerveau est reperfusé et 2/ si l'impact cardiaque de l'ischémie cérébrale est toujours présent à un temps plus lointain de l'initiation de l'AVC.

Suite à ces observations, nous avons souhaité déterminer quelles voies de signalisation cellulaires cardiaques pourraient être modifiées par un AVC préalable et pourraient être impliquées dans ces altérations de la fonction cardiaque induites par l'AVC. Il est bien connu que l'AVC est associé à une activation du SNA sympathique, ce qui est conforme avec nos données qui montrent une augmentation des taux de catécholamines dans les groupes AVC (Min et al. 2009) (Bieber et al. 2017). Il a été démontré qu'un traitement par un β1-bloquant chez des souris victimes d'un AVC améliorait la fonction cardiaque et diminuait les taux de catécholamines 2 mois après l'AVC ischémique et en plus, exerçait un effet neuroprotecteur

au cours de la période de suivi de 7 jours (Bieber et al. 2017) (Goyagi et al. 2010). Dans la présente étude, une régulation à la baisse d'ADRB1 a été observée dans le cœur des rats 2 h après l'embolisation, ce qui pourrait résulter de systèmes de régulation post-traductionnels. Les taux de GDF15 sont également augmentés chez les rats ayant subi un AVC 2 h et 24 h après l'embolisation par rapport aux groupe Sham. Il a été montré que les taux de GDF15 étaient significativement augmentés chez les patients avec un AVC ischémique et encore plus si l'AVC atteignait les grosses artères. En effet, le polymorphisme du gène GDF15 pourrait jouer un rôle dans le développement de l'AVC ischémique (Xiang et al. 2017). Nos travaux tendaient à prouver que le GDF15 circulant proviendrait principalement des aires cérébrales ischémiées (cortex et cervelet) pour lesquelles, seulement 2 h après l'embolisation cérébrale, on observe une spectaculaire augmentation de l'expression de l'ARN messager, et dans une moindre mesure de celle la pro-protéine non mature. Nos observations corroborent les résultats observés au niveau génique par l'équipe de Schindowski après MCAO au niveau de l'hippocampe et du cortex homolatéral (Schindowski et al. 2011). Cependant, contrairement à ce qui a déjà été observé par d'autres équipes (Schober et al. 2001), l'expression génique du GDF15 était également augmentée, plus modérément, au niveau du cortex controlatéral chez les rats ayant subi une embolisation cérébrale droite. Ceci peut s'expliquer par la technique utilisée qui, à l'inverse de la MCAO ou d'une lésion cryogénique, n'induit pas un AVC localisé mais plusieurs petits infarctus. En outre, en raison de la distribution sanguine par le polygone de Willis, il est possible que quelques microsphères rejoignent le territoire controlatéral, ce que nous avons par ailleurs observé dans notre modèle, et qui pourrait être à l'origine de micro-infarctus pouvant conduire à une induction de l'expression du GDF15 du côté controlatéral. Dans les travaux de Schober et Schindowski, l'expression protéique du GDF15, appréhendée par des techniques d'immunohistochimie, était augmentée au niveau de la zone ischémique. L'innovation de notre travail consiste en la découverte d'une activation très précoce de l'expression du GDF15 au niveau de son ARNm et de la pro-protéine non mature, non seulement dans le cerveau, mais aussi dans des organes à distance de la lésion et notamment au niveau du cœur (niveau protéique uniquement). Il est à noter que la forme mature du GDF15 n'a été retrouvée qu'au niveau cardiaque, signant une forme d'activation d'ordre principalement post-traductionnelle. La fonction du GDF15, induit au niveau cardiaque par l'ischémie cérébrale, n'est pas connue avec précision, mais l'évaluation du GDF15 constitue le témoin d'une nouvelle voie d'interaction entre le cerveau et le cœur au cours des processus ischémiques. Selon l'état des connaissances actuelles sur les voies de signalisation cardiaques du GDF15, cette cytokine induirait une cardioprotection en passant

par la voie de la PI3K, d'Akt et d'eNOS, tel qu'il l'a été démontré par l'équipe de Kempf : un inhibiteur de PI3K abolit la cardioprotection du GDF15 au même titre qu'un déficit en Akt (Kempf et al. 2006). Ces résultats sont cohérents avec ce que nous avons observé au niveau génique. En effet, 2 h après l'embolisation cérébrale, l'expression génique de la PI3K et d'Akt était augmentée dans les cœurs des rats des groupes AVC (uniquement à droite pour la PI3K). Ces résultats semblent indiquer que le GDF15 pourrait se fixer sur d'autres cibles que sur le récepteur GFRAL, situé uniquement au niveau cérébral, et notamment sur des tissus à distance tels que le cœur. Il reste toutefois encore à déterminer si dans le contexte de l'AVC, la stimulation des cellules cardiaques par du GDF15 endogène d'origine cardiaque et/ou circulant d'origine cérébral, constitue un facteur délétère ou de cardio-protection. Parallèlement à l'AVC ischémique, plusieurs systèmes neuro-humoraux, y compris des cytokines inflammatoires, sont activés et des données récentes ont montré qu'une inflammation chronique pouvait se propager du cervelet ischémié vers des organes périphériques éloignés comme le cœur (Acosta et al. 2017). La survenue d'un stress nitro-oxydant pourrait aussi être impliquée dans ces interactions entre le cœur et le cerveau, ce qui a été démontré après une MCAO transitoire chez le rat (Altintas, Kumas, and Altintas 2016). L'augmentation d'expression génique et protéique de GPX1, enzyme antioxydante, est à opposer à la diminution de l'expression protéique de la CAT, autre enzyme antioxydante, qui présente une activité 8 fois supérieure à celle de la GPX1 chez l'Homme (Bastaki et al. 2006). De plus, il a été démontré que certaines voies moléculaires cardioprotectrices pourraient être recrutées par le tissu cardiaque afin de lutter contre les effets néfastes des lésions d'ischémie-reperfusion (Cadenas 2018). En prenant en considération l'idée qu'un AVC pourrait altérer la récupération cardiaque post-ischémique, nous avons émis l'hypothèse que certains acteurs moléculaires impliqués dans les voies de cardioprotection pourraient avoir été modifiés suite à l'installation d'une ischémie cérébrale. De fait, l'expression protéique de JAK2, STAT3 et pSTAT3, tous membres de la voie de signalisation de cardioprotection SAFE, était diminuée dans le cœur 2 h après l'embolisation cérébrale. Par conséquent, la vulnérabilité accrue du cœur aux lésions d'ischémie-reperfusion après un AVC pourrait être, du moins en partie, liée à une altération de la voie de signalisation SAFE. Une mise en jeu positive ou une induction pharmacologique de cette voie de signalisation pourrait donc être utilisée comme cible thérapeutique afin de protéger le cœur après un AVC ischémique.

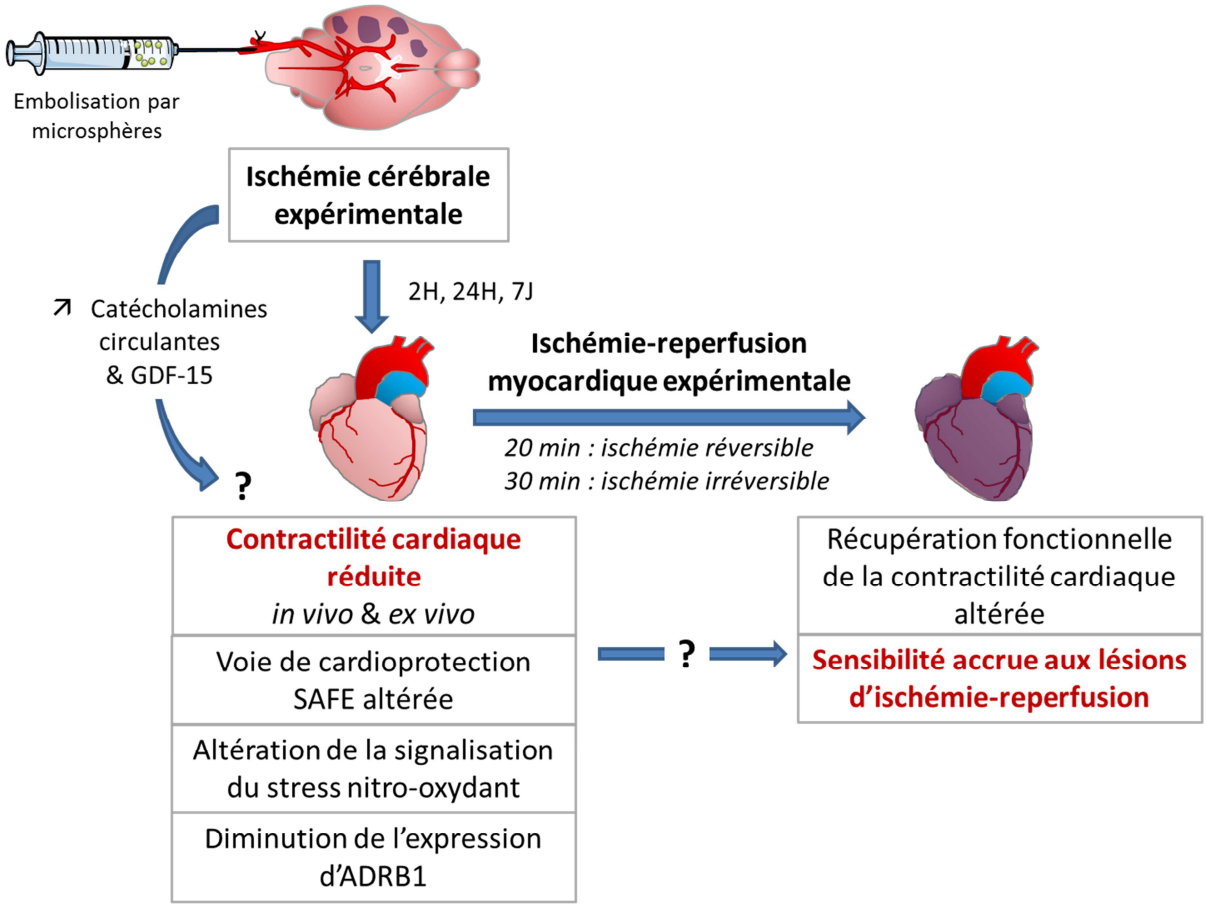


Figure 24 : Schéma de conclusion générale. Un accident vasculaire cérébral expérimental chez le rat, induit par une embolisation par des microsphères, conduit à une altération précoce (2H) et tardive (24H et 7 jours) de la contractilité cardiaque *in vivo* et *ex vivo* (cette dernière n'étant examinée qu'à 2H et 24H). Les voies de cardioprotection SAFE ont été altérées rapidement après l'AVC, de même que la signalisation du stress nitro-oxydant et l'expression de l'ADRB1. Des augmentations des taux de catécholamines et de GDF15 circulants ont été observées à 2H et 24H. De plus, des cœurs isolés ont été soumis à une ischémie globale réversible (20 minutes) ou irréversible (30 minutes) suivie d'une reperfusion, et une altération de la récupération des paramètres fonctionnels cardiaques a été observée ce qui semble démontrer une sensibilité accrue aux lésions d'ischémie-reperfusion du myocarde après un AVC.

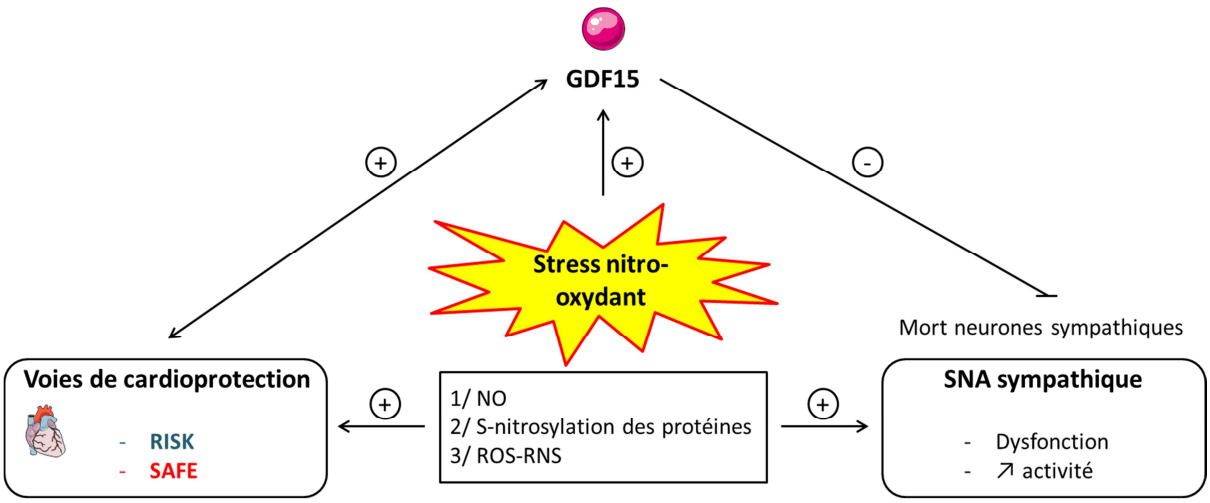


Figure 25 : Interactions entre les différentes voies impliquées dans les incidences cardio-vasculaires de l'ischémie cérébrale. Le stress nitro-oxydant régule l'expression du GDF15, contribue aux voies de cardioprotection et entraine des dysfonctions du SNA sympathique. Les ROS augmentent l'activité du SNA sympathique. Le GDF15 participe à la cardioprotection et s'oppose à la mort des neurones sympathiques.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Les données originales de ce travail indiquent non seulement que, dans un modèle d'embolisation cérébrale chez le rat, les accidents vasculaires cérébraux altèrent la contractilité cardiaque, mais aggravent également la vulnérabilité du myocarde à l'ischémie. Au niveau moléculaire, nous avons mis en évidence une hyperactivité sympathique, une perturbation des régulateurs du stress nitro-oxydant dans le cœur et une altération de la voie de signalisation cardioprotectrice SAFE. L'induction de la synthèse de GDF15 au niveau cérébral et à distance de la lésion laisse imaginer un rôle de cette cytokine sur les interactions entre le cerveau et le cœur au cours des processus ischémiques. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la mise en place des altérations du myocarde induites par une embolisation cérébrale restent à établir. Ils apparaissent toutefois être sous la dépendance de l'activité du système nerveux sympathique ou le stress nitro-oxydant. La piste du GDF15 est à explorer de manière approfondie afin de déterminer son impact, bénéfique ou délétère, au niveau cardiaque. En effet, il existe une certaine ambivalence concernant les fonctions de cette cytokine, qui est actuellement utilisée en clinique comme un biomarqueur de mortalité globale dans de nombreuses pathologies. Son évaluation en clinique pourrait s'avérer riche de renseignements en thérapeutique si son effet protecteur est démontré. D'un point de vue clinique, ces résultats pourraient être d'une importance majeure pour la prise en charge des patients victimes d'un AVC, afin d'induire une protection cardiaque suite à l'installation d'une ischémie cérébrale.

BIBLIOGRAPHIE

Abanador-Kamper, N., L. Kamper, J. Wolfertz, M. Vorpahl, P. Haage, and M. Seyfarth. 2018. 'Temporarily increased stroke rate after Takotsubo syndrome: need for an anticoagulation?', *BMC Cardiovasc Disord*, 18: 117.

Abdendi, K. 2002. 'L'arrêt du tabac chez le coronarien', *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 51: 357-66.

Ackermann, K., G. A. Bonaterra, R. Kinscherf, and A. Schwarz. 2019. 'Growth differentiation factor-15 regulates oxLDL-induced lipid homeostasis and autophagy in human macrophages', *Atherosclerosis*, 281: 128-36.

Acosta, S. A., S. Mashkouri, D. Nwokoye, J. Y. Lee, and C. V. Borlongan. 2017. 'Chronic inflammation and apoptosis propagate in ischemic cerebellum and heart of non-human primates', *Oncotarget*, 8: 102820-34.

Ago, T., and J. Sadoshima. 2006. 'GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein', *Circulation Research*, 98: 294-7.

Ahn, S. H., Y. H. Kim, C. H. Shin, J. S. Lee, B. J. Kim, Y. J. Kim, S. M. Noh, S. M. Kim, H. G. Kang, D. W. Kang, J. S. Kim, and S. U. Kwon. 2016. 'Cardiac Vulnerability to Cerebrogenic Stress as a Possible Cause of Troponin Elevation in Stroke', *J Am Heart Assoc*, 5.

Airaksinen, M. S., L. Holm, and T. Hatinen. 2006. 'Evolution of the GDNF family ligands and receptors', *Brain Behav Evol*, 68: 181-90.

Akiyama, M., K. Okano, Y. Fukada, and T. Okano. 2009. 'Macrophage inhibitory cytokine MIC-1 is upregulated by short-wavelength light in cultured normal human dermal fibroblasts', *FEBS Lett*, 583: 933-7.

Albertoni, M., P. H. Shaw, M. Nozaki, S. Godard, M. Tenan, M. F. Hamou, D. W. Fairlie, S. N. Breit, V. M. Paralkar, N. de Tribolet, E. G. Van Meir, and M. E. Hegi. 2002. 'Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1', *Oncogene*, 21: 4212-9.

Alqahtani, F., S. Aljohani, A. Tarabishy, T. Busu, A. Adcock, and M. Alkhouli. 2017. 'Incidence and Outcomes of Myocardial Infarction in Patients Admitted With Acute Ischemic Stroke', *Stroke*, 48: 2931-38.

Altena, R., R. S. Fehrmann, H. Boer, E. G. de Vries, C. Meijer, and J. A. Gietema. 2015. 'Growth differentiation factor 15 (GDF-15) plasma levels increase during bleomycin- and cisplatin-based treatment of testicular cancer patients and relate to endothelial damage', *PLoS One*, 10: e0115372.

Altintas, O., M. Kumas, and M. O. Altintas. 2016. 'Neuroprotective effect of ischemic preconditioning via modulating the expression of adropin and oxidative markers against transient cerebral ischemia in diabetic rats', *Peptides*, 79: 31-8.

Amarenco, P., L. B. Goldstein, M. Messig, B. J. O'Neill, A. Callahan, 3rd, H. Sillesen, M. G. Hennerici, J. A. Zivin, K. M. Welch, and Sparcl Investigators. 2009. 'Relative and cumulative effects of lipid and blood pressure control in the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels trial', *Stroke*, 40: 2486-92.

Anand, I. S., T. Kempf, T. S. Rector, H. Tapken, T. Allhoff, F. Jantzen, M. Kuskowski, J. N. Cohn, H. Drexler, and K. C. Wollert. 2010. 'Serial measurement of growth-differentiation factor-15 in heart failure: relation to disease severity and prognosis in the Valsartan Heart Failure Trial', *Circulation*, 122: 1387-95.

Andersson, C., S. R. Preis, A. Beiser, C. DeCarli, K. C. Wollert, T. J. Wang, J. L. Januzzi, Jr., R. S. Vasan, and S. Seshadri. 2015. 'Associations of Circulating Growth Differentiation Factor-15 and ST2 Concentrations With Subclinical Vascular Brain Injury and Incident Stroke', *Stroke*, 46: 2568-75.

Ay, H., W. J. Koroshetz, T. Benner, M. G. Vangel, C. Melinosky, E. M. Arsava, C. Ayata, M. Zhu, L. H. Schwamm, and A. G. Sorensen. 2006. 'Neuroanatomic correlates of stroke-related myocardial injury', *Neurology*, 66: 1325-9.

Baek, S. J., and T. Eling. 2019. 'Growth differentiation factor 15 (GDF15): A survival protein with therapeutic potential in metabolic diseases', *Pharmacol Ther*.

Baigent, C., A. Keech, P. M. Kearney, L. Blackwell, G. Buck, C. Pollicino, A. Kirby, T. Sourjina, R. Peto, R. Collins, R. Simes, and Collaborators Cholesterol Treatment Trialists. 2005. 'Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins', *Lancet*, 366: 1267-78.

Barber, M., J. J. Morton, P. W. Macfarlane, N. Barlow, G. Roditi, and D. J. Stott. 2007. 'Elevated troponin levels are associated with sympathoadrenal activation in acute ischaemic stroke', *Cerebrovasc Dis*, 23: 260-6.

Bastaki, M., K. Huen, P. Manzanillo, N. Chande, C. Chen, J. R. Balmes, I. B. Tager, and N. Holland. 2006. 'Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans', *Pharmacogenet Genomics*, 16: 279-86.

Bauskin, A. R., D. A. Brown, S. Junankar, K. K. Rasiah, S. Eggleton, M. Hunter, T. Liu, D. Smith, T. Kuffner, G. J. Pankhurst, H. Johnen, P. J. Russell, W. Barret, P. D. Stricker, J. J. Grygiel, J. G. Kench, S. M. Henshall, R. L. Sutherland, and S. N. Breit. 2005. 'The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome', *Cancer Res*, 65: 2330-6.

Bauskin, A. R., H. P. Zhang, W. D. Fairlie, X. Y. He, P. K. Russell, A. G. Moore, D. A. Brown, K. K. Stanley, and S. N. Breit. 2000. 'The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1', *EMBO J*, 19: 2212-20.

Bejot, Y., E. Benzenine, L. Lorgis, M. Zeller, H. Aube, M. Giroud, Y. Cottin, and C. Quantin. 2011. 'Comparative analysis of patients with acute coronary and cerebrovascular syndromes from the national French hospitalization health care system database', *Neuroepidemiology*, 37: 143-52.

Bejot, Y; Giroud, M; Rouaud, O; Benatru, I; Moreau, T; Freycz, M; Osseby, GV. 2007. 'Évolution sur vingt ans des taux d'incidence et de mortalité des AVC au sein de la population de Dijon intra-muros : 1985-2004', *Bulletin de l'académie nationale de médecine*: 305-25.

Bere, Z., T. P. Obrenovitch, G. Kozak, F. Bari, and E. Farkas. 2014. 'Imaging reveals the focal area of spreading depolarizations and a variety of hemodynamic responses in a rat microembolic stroke model', *J Cereb Blood Flow Metab*, 34: 1695-705.

Berkhemer, O. A., P. S. Fransen, D. Beumer, L. A. van den Berg, H. F. Lingsma, A. J. Yoo, W. J. Schonewille, J. A. Vos, P. J. Nederkoorn, M. J. Wermer, M. A. van Walderveen, J. Staals, J. Hofmeijer, J. A. van Oostayen, G. J. Lycklama a Nijeholt, J. Boiten, P. A.

Brouwer, B. J. Emmer, S. F. de Bruijn, L. C. van Dijk, L. J. Kappelle, R. H. Lo, E. J. van Dijk, J. de Vries, P. L. de Kort, W. J. van Rooij, J. S. van den Berg, B. A. van Hasselt, L. A. Aerden, R. J. Dallinga, M. C. Visser, J. C. Bot, P. C. Vroomen, O. Eshghi, T. H. Schreuder, R. J. Heijboer, K. Keizer, A. V. Tielbeek, H. M. den Hertog, D. G. Gerrits, R. M. van den Berg-Vos, G. B. Karas, E. W. Steyerberg, H. Z. Flach, H. A. Marquering, M. E. Sprengers, S. F. Jenniskens, L. F. Beenen, R. van den Berg, P. J. Koudstaal, W. H. van Zwam, Y. B. Roos, A. van der Lugt, R. J. van Oostenbrugge, C. B. Majoie, D. W. Dippel, and Mr Clean Investigators. 2015. 'A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke', *N Engl J Med*, 372: 11-20.

Bettencourt, P., J. Ferreira-Coimbra, P. Rodrigues, P. Marques, H. Moreira, M. J. Pinto, J. T. Guimaraes, and P. Lourenco. 2018. 'Towards a multi-marker prognostic strategy in acute heart failure: a role for GDF-15', *ESC Heart Fail*, 5: 1017-22.

Bieber, M., R. A. Werner, E. Tanai, U. Hofmann, T. Higuchi, K. Schuh, P. U. Heuschmann, S. Frantz, O. Ritter, P. Kraft, and C. Kleinschnitz. 2017. 'Stroke-induced chronic systolic dysfunction driven by sympathetic overactivity', *Ann Neurol*, 82: 729-43.

Bonaterra, G. A., S. Zugel, J. Thogersen, S. A. Walter, U. Haberkorn, J. Strelau, and R. Kinscherf. 2012. 'Growth differentiation factor-15 deficiency inhibits atherosclerosis progression by regulating interleukin-6-dependent inflammatory response to vascular injury', *J Am Heart Assoc*, 1: e002550.

Bootcov, M. R., A. R. Bauskin, S. M. Valenzuela, A. G. Moore, M. Bansal, X. Y. He, H. P. Zhang, M. Donnellan, S. Mahler, K. Pryor, B. J. Walsh, R. C. Nicholson, W. D. Fairlie, S. B. Por, J. M. Robbins, and S. N. Breit. 1997. 'MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 11514-9.

Bottner, M., M. Laaff, B. Schechinger, G. Rappold, K. Unsicker, and C. Suter-Crazzolara. 1999. 'Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1)', *Gene*, 237: 105-11.

Boulanger, M., Y. Bejot, P. M. Rothwell, and E. Touze. 2018. 'Long-Term Risk of Myocardial Infarction Compared to Recurrent Stroke After Transient Ischemic Attack and Ischemic Stroke: Systematic Review and Meta-Analysis', *J Am Heart Assoc*, 7.

Boyer, N. M., W. K. Laskey, M. Cox, A. F. Hernandez, E. D. Peterson, D. L. Bhatt, C. P. Cannon, and G. C. Fonarow. 2012. 'Trends in clinical, demographic, and biochemical characteristics of patients with acute myocardial infarction from 2003 to 2008: a report from the american heart association get with the guidelines coronary artery disease program', *J Am Heart Assoc*, 1: e001206.

Burchfiel, C. M., J. D. Curb, B. L. Rodriguez, R. D. Abbott, D. Chiu, and K. Yano. 1994. 'Glucose intolerance and 22-year stroke incidence. The Honolulu Heart Program', *Stroke*, 25: 951-7.

Butcher, K. S., and D. F. Cechetto. 1995. 'Insular lesion evokes autonomic effects of stroke in normotensive and hypertensive rats', *Stroke*, 26: 459-65.

Butcher, K. S., V. C. Hachinski, J. X. Wilson, C. Guiraudon, and D. F. Cechetto. 1993. 'Cardiac and sympathetic effects of middle cerebral artery occlusion in the spontaneously hypertensive rat', *Brain Res*, 621: 79-86.

Byun, Y. S., X. Yang, W. Bao, D. DeMicco, R. Laskey, J. L. Witztum, S. Tsimikas, and Sparcl Trial Investigators. 2017. 'Oxidized Phospholipids on Apolipoprotein B-100 and Recurrent Ischemic Events Following Stroke or Transient Ischemic Attack', *J Am Coll Cardiol*, 69: 147-58.

Cadenas, S. 2018. 'ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection', *Free Radical Biology & Medicine*, 117: 76-89.

Cechetto, D. F., J. X. Wilson, K. E. Smith, D. Wolski, M. D. Silver, and V. C. Hachinski. 1989. 'Autonomic and myocardial changes in middle cerebral artery occlusion: stroke models in the rat', *Brain Res*, 502: 296-305.

Chalouhi, N., B. Daou, T. Okabe, R. M. Starke, R. Dalyai, C. D. Bovenzi, E. C. Anderson, G. Barros, A. Reese, P. Jabbour, S. Tjoumakaris, R. Rosenwasser, W. K. Kraft, and F. Rincon. 2016. 'Beta-blocker therapy and impact on outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a cohort study', *J Neurosurg*: 1-7.

Chen, J., C. Cui, X. Yang, J. Xu, P. Venkat, A. Zacharek, P. Yu, and M. Chopp. 2017. 'MiR-126 Affects Brain-Heart Interaction after Cerebral Ischemic Stroke', *Transl Stroke Res*, 8: 374-85.

Chen, M., L. Ren, Y. Meng, L. Shi, L. Chen, B. Yu, Q. Wu, and G. Qi. 2018. 'The protease inhibitor E64d improves ox-LDL-induced endothelial dysfunction in human aortic endothelial cells', *Can J Physiol Pharmacol*, 96: 120-27.

Cheung, R. T., and V. Hachinski. 2004. 'Cardiac Effects of Stroke', *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 6: 199-207.

Cheung, R. T., V. C. Hachinski, and D. F. Cechetto. 1997. 'Cardiovascular response to stress after middle cerebral artery occlusion in rats', *Brain Res*, 747: 181-8.

Colivicchi, F., A. Bassi, M. Santini, and C. Caltagirone. 2004. 'Cardiac autonomic derangement and arrhythmias in right-sided stroke with insular involvement', *Stroke*, 35: 2094-8.

Collins, R., and S. MacMahon. 1994. 'Blood pressure, antihypertensive drug treatment and the risks of stroke and of coronary heart disease', *Br Med Bull*, 50: 272-98.

Collins, R., R. Peto, S. MacMahon, P. Hebert, N. H. Fiebach, K. A. Eberlein, J. Godwin, N. Qizilbash, J. O. Taylor, and C. H. Hennekens. 1990. 'Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context', *Lancet*, 335: 827-38.

Cruickshank, J. M., G. Neil-Dwyer, J. P. Degaute, Y. Hayes, T. Kuurne, J. Kytta, J. L. Vincent, M. E. Carruthers, and S. Patel. 1987. 'Reduction of stress/catecholamine-induced cardiac necrosis by beta 1-selective blockade', *Lancet*, 2: 585-9.

Csecsei, P., G. Pusch, E. Ezer, T. Berki, L. Szapary, Z. Illes, and T. Molnar. 2018. 'Relationship between Cardiac Troponin and Thrombo-Inflammatory Molecules in Prediction of Outcome after Acute Ischemic Stroke', *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 27: 951-56.

Daniels, L. B., P. Clopton, G. A. Laughlin, A. S. Maisel, and E. Barrett-Connor. 2011. 'Growth-differentiation factor-15 is a robust, independent predictor of 11-year mortality risk in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study', *Circulation*, 123: 2101-10.

de Caestecker, M. 2004. 'The transforming growth factor-beta superfamily of receptors', *Cytokine Growth Factor Rev*, 15: 1-11.

de Jager, S. C., B. Bermudez, I. Bot, R. R. Koenen, M. Bot, A. Kavelaars, V. de Waard, C. J. Heijnen, F. J. Muriana, C. Weber, T. J. van Berkel, J. Kuiper, S. J. Lee, R. Abia, and E. A. Biessen. 2011. 'Growth differentiation factor 15 deficiency protects against atherosclerosis by attenuating CCR2-mediated macrophage chemotaxis', *J Exp Med*, 208: 217-25.

de Zeeuw, S., T. W. Lameris, D. J. Duncker, D. Hasan, F. Boomsma, A. H. van den Meiracker, and P. D. Verdouw. 2001. 'Cardioprotection in pigs by exogenous norepinephrine but not by cerebral ischemia-induced release of endogenous norepinephrine', *Stroke*, 32: 767-74.

Derynck, R., and E. H. Budi. 2019. 'Specificity, versatility, and control of TGF-beta family signaling', *Sci Signal*, 12.

Derynck, R., and Y. E. Zhang. 2003. 'Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling', *Nature*, 425: 577-84.

Diaz, K. M., V. J. Howard, B. Hutto, N. Colabianchi, J. E. Vena, M. M. Safford, S. N. Blair, and S. P. Hooker. 2017. 'Patterns of Sedentary Behavior and Mortality in U.S. Middle-Aged and Older Adults: A National Cohort Study', *Ann Intern Med*, 167: 465-75.

'Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group'. 1998. *Lancet*, 352: 854-65.

Eggers, K. M., T. Kempf, B. Lagerqvist, B. Lindahl, S. Olofsson, F. Jantzen, T. Peter, T. Allhoff, A. Siegbahn, P. Venge, K. C. Wollert, and L. Wallentin. 2010. 'Growth-differentiation factor-15 for long-term risk prediction in patients stabilized after an episode of non-ST-segment-elevation acute coronary syndrome', *Circ Cardiovasc Genet*, 3: 88-96.

Eitel, I., P. Blase, V. Adams, L. Hildebrand, S. Desch, G. Schuler, and H. Thiele. 2011. 'Growth-differentiation factor 15 as predictor of mortality in acute reperfused ST-elevation myocardial infarction: insights from cardiovascular magnetic resonance', *Heart*, 97: 632-40.

Emberson, J., K. R. Lees, P. Lyden, L. Blackwell, G. Albers, E. Bluhmki, T. Brott, G. Cohen, S. Davis, G. Donnan, J. Grotta, G. Howard, M. Kaste, M. Koga, R. von Kummer, M. Lansberg, R. I. Lindley, G. Murray, J. M. Olivot, M. Parsons, B. Tilley, D. Toni, K. Toyoda, N. Wahlgren, J. Wardlaw, W. Whiteley, G. J. del Zoppo, C. Baigent, P. Sandercock, W. Hacke, and Group Stroke Thrombolysis Trialists' Collaborative. 2014. 'Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials', *Lancet*, 384: 1929-35.

Emmerson, P. J., K. L. Duffin, S. Chintharlapalli, and X. Wu. 2018. 'GDF15 and Growth Control', *Front Physiol*, 9: 1712.

Emmerson, P. J., F. Wang, Y. Du, Q. Liu, R. T. Pickard, M. D. Gonciarz, T. Coskun, M. J. Hamang, D. K. Sindelar, K. K. Ballman, L. A. Foltz, A. Muppidi, J. Alsina-Fernandez, G. C. Barnard, J. X. Tang, X. Liu, X. Mao, R. Siegel, J. H. Sloan, P. J. Mitchell, B. B. Zhang, R. E. Gimeno, B. Shan, and X. Wu. 2017. 'The metabolic

effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL', *Nat Med*, 23: 1215-19.

European Heart Rhythm, Association, Surgery European Association for Cardio-Thoracic, A. J. Camm, P. Kirchhof, G. Y. Lip, U. Schotten, I. Savelieva, S. Ernst, I. C. Van Gelder, N. Al-Attar, G. Hindricks, B. Prendergast, H. Heidbuchel, O. Alfieri, A. Angelini, D. Atar, P. Colonna, R. De Caterina, J. De Sutter, A. Goette, B. Gorenek, M. Heldal, S. H. Hohloser, P. Kolh, J. Y. Le Heuzey, P. Ponikowski, and F. H. Rutten. 2010. 'Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC)', *Eur Heart J*, 31: 2369-429.

Fairlie, W. D., H. P. Zhang, W. M. Wu, S. L. Pankhurst, A. R. Bauskin, P. K. Russell, P. K. Brown, and S. N. Breit. 2001. 'The propeptide of the transforming growth factor-beta superfamily member, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), is a multifunctional domain that can facilitate protein folding and secretion', *Journal of Biological Chemistry*, 276: 16911-8.

Falk, M., R. Huhn, F. Behmenburg, S. Ritz-Timme, and F. Mayer. 2018. 'Biomechanical stress in myocardial infarctions: can endothelin-1 and growth differentiation factor 15 serve as immunohistochemical markers?', *Int J Legal Med*, 132: 509-18.

Fang, C. X., S. Wu, and J. Ren. 2006. 'Intracerebral hemorrhage elicits aberration in cardiomyocyte contractile function and intracellular Ca2+ transients', *Stroke*, 37: 1875-82.

Fielder, G. C., T. W. Yang, M. Razdan, Y. Li, J. Lu, J. K. Perry, P. E. Lobie, and D. X. Liu. 2018. 'The GDNF Family: A Role in Cancer?', *Neoplasia*, 20: 99-117.

Frank, D., C. Kuhn, B. Brors, C. Hanselmann, M. Ludde, H. A. Katus, and N. Frey. 2008. 'Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program', *Hypertension*, 51: 309-18.

Fujita, Y., Y. Taniguchi, S. Shinkai, M. Tanaka, and M. Ito. 2016. 'Secreted growth differentiation factor 15 as a potential biomarker for mitochondrial dysfunctions in aging and age-related disorders', *Geriatr Gerontol Int*, 16 Suppl 1: 17-29.

Furie, K. L., S. E. Kasner, R. J. Adams, G. W. Albers, R. L. Bush, S. C. Fagan, J. L. Halperin, S. C. Johnston, I. Katzan, W. N. Kernan, P. H. Mitchell, B. Ovbiagele, Y. Y. Palesch, R. L. Sacco, L. H. Schwamm, S. Wassertheil-Smoller, T. N. Turan, D. Wentworth, Council on Cardiovascular Nursing Council on Clinical Cardiology American Heart Association Stroke Council, Care Interdisciplinary Council on Quality of, and Research Outcomes. 2011. 'Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association', *Stroke*, 42: 227-76.

George, M., A. Jena, V. Srivatsan, R. Muthukumar, and V. E. Dhandapani. 2016. 'GDF 15--A Novel Biomarker in the Offing for Heart Failure', *Curr Cardiol Rev*, 12: 37-46.

Gnonlonfoun, D., C. Adjien, R. Gnimavo, G. Goudjinou, C. Hotcho, J. Nyangui Mapaga, A. Sowanou, P. Gnigone, R. Domingo, and D. Houinato. 2018. 'Ischemic stroke due to embolic heart diseases and associated factors in Benin hospital setting', *J Neurol Sci*, 387: 124-28.

Goldstein, L. B., P. Amarenco, J. Zivin, M. Messig, I. Altafullah, A. Callahan, M. Hennerici, M. J. MacLeod, H. Sillesen, R. Zweifler, K. Michael, A. Welch, and Investigators Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels. 2009. 'Statin treatment and stroke outcome in the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) trial', *Stroke*, 40: 3526-31.

Gordon, T., W. P. Castelli, M. C. Hjortland, W. B. Kannel, and T. R. Dawber. 1977. 'High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study', *Am J Med*, 62: 707-14.

Goyagi, T., T. Horiguchi, T. Nishikawa, and Y. Tobe. 2010. 'Post-treatment with selective beta1 adrenoceptor antagonists provides neuroprotection against transient focal ischemia in rats', *Brain Res*, 1343: 213-7.

Groschel, K., S. Schnaudigel, F. Edelmann, C. F. Niehaus, M. Weber-Kruger, B. Haase, R. Lahno, J. Seegers, K. Wasser, J. Wohlfahrt, D. Vollmann, R. Stahrenberg, and R. Wachter. 2012. 'Growth-differentiation factor-15 and functional outcome after acute ischemic stroke', *J Neurol*, 259: 1574-9.

Group, Iona Study. 2002. 'Effect of nicorandil on coronary events in patients with stable angina: the Impact Of Nicorandil in Angina (IONA) randomised trial', *Lancet*, 359: 1269-75.

Group, Progress Collaborative. 2001. 'Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack', *Lancet*, 358: 1033-41.

Grundy, S. M., J. I. Cleeman, C. N. Merz, H. B. Brewer, Jr., L. T. Clark, D. B. Hunninghake, R. C. Pasternak, S. C. Smith, Jr., N. J. Stone, Lung National Heart, Institute Blood, Foundation American College of Cardiology, and Association American Heart. 2004. 'Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines', *Circulation*, 110: 227-39.

Guenancia, C., A. Kahli, G. Laurent, O. Hachet, G. Malapert, S. Grosjean, C. Girard, C. Vergely, and O. Bouchot. 2015. 'Pre-operative growth differentiation factor 15 as a novel biomarker of acute kidney injury after cardiac bypass surgery', *Int J Cardiol*, 197: 66-71.

Gunawardena, R., A. Cheung, P. Spira, J. He, J. Wenderoth, and A. H. Y. Chiu. 2017. 'Successful endovascular thrombectomy 90h after stroke onset', *J Clin Neurosci*, 46: 69-71.

Gunnoo, T., N. Hasan, M. S. Khan, J. Slark, P. Bentley, and P. Sharma. 2016. 'Quantifying the risk of heart disease following acute ischaemic stroke: a meta-analysis of over 50,000 participants', *BMJ Open*, 6: e009535.

Guo, Y., X. J. Yue, H. H. Li, Z. X. Song, H. Q. Yan, P. Zhang, Y. K. Gui, L. Chang, and T. Li. 2016. 'Overweight and Obesity in Young Adulthood and the Risk of Stroke: a Meta-analysis', *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 25: 2995-3004.

Hachet, O., C. Guenancia, K. Stamboul, B. Daubail, C. Richard, Y. Bejot, V. Yameogo, A. Gudjoncik, Y. Cottin, M. Giroud, and L. Lorgis. 2014. 'Frequency and predictors of stroke after acute myocardial infarction: specific aspects of in-hospital and postdischarge events', *Stroke*, 45: 3514-20.

Hachinski, V. C., S. M. Oppenheimer, J. X. Wilson, C. Guiraudon, and D. F. Cechetto. 1992. 'Asymmetry of sympathetic consequences of experimental stroke', *Arch Neurol*, 49: 697-702.

Hachinski, V. C., J. X. Wilson, K. E. Smith, and D. F. Cechetto. 1992. 'Effect of age on autonomic and cardiac responses in a rat stroke model', *Arch Neurol*, 49: 690-6.

Hagstrom, E., S. K. James, M. Bertilsson, R. C. Becker, A. Himmelmann, S. Husted, H. A. Katus, P. G. Steg, R. F. Storey, A. Siegbahn, L. Wallentin, and Plato Investigators. 2016. 'Growth differentiation factor-15 level predicts major bleeding and cardiovascular events in patients with acute coronary syndromes: results from the PLATO study', *Eur Heart J*, 37: 1325-33.

Hammar, N., L. Alfredsson, and J. V. Johnson. 1998. 'Job strain, social support at work, and incidence of myocardial infarction', *Occup Environ Med*, 55: 548-53.

Hausenloy, D. J., and D. M. Yellon. 2008. 'Preconditioning and postconditioning: new strategies for cardioprotection', *Diabetes Obes Metab*, 10: 451-9.

Hijazi, Z., J. Oldgren, U. Andersson, S. J. Connolly, J. W. Eikelboom, M. D. Ezekowitz, P. A. Reilly, S. Yusuf, A. Siegbahn, and L. Wallentin. 2017. 'Growth-differentiation factor 15 and risk of major bleeding in atrial fibrillation: Insights from the Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy (RE-LY) trial', *Am Heart J*, 190: 94-103.

Ho, J. E., A. Mahajan, M. H. Chen, M. G. Larson, E. L. McCabe, A. Ghorbani, S. Cheng, A. D. Johnson, C. M. Lindgren, T. Kempf, L. Lind, E. Ingelsson, R. S. Vasan, J. Januzzi, K. C. Wollert, A. P. Morris, and T. J. Wang. 2012. 'Clinical and genetic correlates of growth differentiation factor 15 in the community', *Clin Chem*, 58: 1582-91.

Hossmann, K. A. 1998. 'Experimental models for the investigation of brain ischemia', *Cardiovascular Research*, 39: 106-20.

Hromas, R., M. Hufford, J. Sutton, D. Xu, Y. Li, and L. Lu. 1997. 'PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein', *Biochim Biophys Acta*, 1354: 40-4.

Hsu, J. Y., S. Crawley, M. Chen, D. A. Ayupova, D. A. Lindhout, J. Higbee, A. Kutach, W. Joo, Z. Gao, D. Fu, C. To, K. Mondal, B. Li, A. Kekatpure, M. Wang, T. Laird, G. Horner, J. Chan, M. McEntee, M. Lopez, D. Lakshminarasimhan, A. White, S. P. Wang, J. Yao, J. Yie, H. Matern, M. Solloway, R. Haldankar, T. Parsons, J. Tang, W. D. Shen, Y. Alice Chen, H. Tian, and B. B. Allan. 2017. 'Non-homeostatic body weight regulation through a brainstem-restricted receptor for GDF15', *Nature*, 550: 255-59.

Hu, X. F., R. Zhan, S. Xu, J. Wang, J. Wu, X. Liu, Y. Li, and L. Chen. 2018. 'Growth differentiation factor 15 is associated with left atrial/left atrial appendage thrombus in patients with nonvalvular atrial fibrillation', *Clin Cardiol*, 41: 34-38.

Huisa, B. N., A. B. Stemer, and J. A. Zivin. 2010. 'Atorvastatin in stroke: a review of SPARCL and subgroup analysis', *Vasc Health Risk Manag*, 6: 229-36.

Intachai, K., C. Chattipakorn S, N. Chattipakorn, and K. Shinlapawittayatorn. 2018. 'Revisiting the Cardioprotective Effects of Acetylcholine Receptor Activation against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury', *Int J Mol Sci*, 19.

'Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group'. 1998. *Lancet*, 352: 837-53.

Investigators, Enos Trial, P. M. Bath, L. Woodhouse, P. Scutt, K. Krishnan, J. M. Wardlaw, D. Bereczki, N. Sprigg, E. Berge, M. Beridze, V. Caso, C. Chen, H. Christensen, R. Collins, A. El Etribi, A. C. Laska, K. R. Lees, S. Ozturk, S. Phillips, S. Pocock, H. A. de Silva, S. Szatmari, and S. Utton. 2015. 'Efficacy of nitric oxide, with or without continuing antihypertensive treatment, for management of high blood pressure in acute stroke (ENOS): a partial-factorial randomised controlled trial', *Lancet*, 385: 617-28.

Ishikawa, H., N. Tajiri, J. Vasconcellos, Y. Kaneko, O. Mimura, M. Dezawa, and C. V. Borlongan. 2013. 'Ischemic stroke brain sends indirect cell death signals to the heart', *Stroke*, 44: 3175-82.

Jiang, J., A. Thalamuthu, J. E. Ho, A. Mahajan, W. E. Ek, D. A. Brown, S. N. Breit, T. J. Wang, U. Gyllensten, M. H. Chen, S. Enroth, J. L. Januzzi, Jr., L. Lind, N. J. Armstrong, J. B. Kwok, P. R. Schofield, W. Wen, J. N. Trollor, A. Johansson, A. P. Morris, R. S. Vasan, P. S. Sachdev, and K. A. Mather. 2018. 'A Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies of Growth Differentiation Factor-15 Concentration in Blood', *Front Genet*, 9: 97.

Jiang, J., J. N. Trollor, D. A. Brown, J. D. Crawford, A. Thalamuthu, E. Smith, S. N. Breit, T. Liu, H. Brodaty, B. T. Baune, P. S. Sachdev, and W. Wen. 2015. 'An inverse relationship between serum macrophage inhibitory cytokine-1 levels and brain white matter integrity in community-dwelling older individuals', *Psychoneuroendocrinology*, 62: 80-8.

Jung, J. M., J. G. Kim, J. B. Kim, K. H. Cho, S. Yu, K. Oh, Y. H. Kim, J. Y. Choi, and W. K. Seo. 2016. 'Takotsubo-Like Myocardial Dysfunction in Ischemic Stroke: A Hospital-Based Registry and Systematic Literature Review', *Stroke*, 47: 2729-36.

Jusufovic, M., E. C. Sandset, P. M. Bath, E. Berge, and Group Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial Study. 2016. 'Early blood pressure lowering treatment in acute stroke. Ordinal analysis of vascular events in the Scandinavian Candesartan Acute Stroke Trial (SCAST)', *J Hypertens*, 34: 1594-8.

Kadowaki, M., H. Yoshioka, H. Kamitani, T. Watanabe, P. A. Wade, and T. E. Eling. 2012. 'DNA methylation-mediated silencing of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1/GDF15) in glioma cell lines', *Int J Cancer*, 130: 267-77.

Kahli, A., C. Guenancia, M. Zeller, S. Grosjean, K. Stamboul, L. Rochette, C. Girard, and C. Vergely. 2014. 'Growth differentiation factor-15 (GDF-15) levels are associated with cardiac and renal injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass', *PLoS One*, 9: e105759.

Kakihana, M., A. Shino, and A. Nagaoka. 1983. 'Cardiovascular responses to cerebral ischemia following bilateral carotid artery occlusion in SHRSP, SHRSR and WKY rats', *Jpn J Pharmacol*, 33: 17-26.

Kang, K., T. H. Park, N. Kim, M. U. Jang, S. S. Park, J. M. Park, Y. Ko, S. Lee, K. B. Lee, J. Lee, D. E. Kim, Y. J. Cho, J. T. Kim, D. H. Kim, J. K. Cha, M. K. Han, J. S. Lee, J. Lee, M. S. Oh, J. C. Choi, B. C. Lee, K. S. Hong, and H. J. Bae. 2016. 'Recurrent Stroke, Myocardial Infarction, and Major Vascular Events during the First Year after

Acute Ischemic Stroke: The Multicenter Prospective Observational Study about Recurrence and Its Determinants after Acute Ischemic Stroke I', *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 25: 656-64.

Kannel, W. B., and D. L. McGee. 1979. 'Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study', *Circulation*, 59: 8-13.

Kempf, T., M. Eden, J. Strelau, M. Naguib, C. Willenbockel, J. Tongers, J. Heineke, D. Kotlarz, J. Xu, J. D. Molkentin, H. W. Niessen, H. Drexler, and K. C. Wollert. 2006. 'The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury', *Circulation Research*, 98: 351-60.

Kempf, T., R. Horn-Wichmann, G. Brabant, T. Peter, T. Allhoff, G. Klein, H. Drexler, N. Johnston, L. Wallentin, and K. C. Wollert. 2007. 'Circulating concentrations of growth-differentiation factor 15 in apparently healthy elderly individuals and patients with chronic heart failure as assessed by a new immunoradiometric sandwich assay', *Clin Chem*, 53: 284-91.

Kempf, T., A. Zarbock, C. Widera, S. Butz, A. Stadtmann, J. Rossaint, M. Bolomini-Vittori, M. Korf-Klingebiel, L. C. Napp, B. Hansen, A. Kanwischer, U. Bavendiek, G. Beutel, M. Hapke, M. G. Sauer, C. Laudanna, N. Hogg, D. Vestweber, and K. C. Wollert. 2011. 'GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice', *Nat Med*, 17: 581-8.

Kernan, W. N., C. M. Viscoli, J. L. Dearborn, D. M. Kent, R. Conwit, P. Fayad, K. L. Furie, M. Gorman, P. D. Guarino, S. E. Inzucchi, A. Stuart, L. H. Young, and Investigators Insulin Resistance Intervention After Stroke Trial. 2017. 'Targeting Pioglitazone Hydrochloride Therapy After Stroke or Transient Ischemic Attack According to Pretreatment Risk for Stroke or Myocardial Infarction', *JAMA Neurol*, 74: 1319-27.

Kishore, A., A. Vail, A. Majid, J. Dawson, K. R. Lees, P. J. Tyrrell, and C. J. Smith. 2014. 'Detection of atrial fibrillation after ischemic stroke or transient ischemic attack: a systematic review and meta-analysis', *Stroke*, 45: 520-6.

Kivimaki, M., S. T. Nyberg, G. D. Batty, E. I. Fransson, K. Heikkila, L. Alfredsson, J. B. Bjorner, M. Borritz, H. Burr, A. Casini, E. Clays, D. De Bacquer, N. Dragano, J. E. Ferrie, G. A. Geuskens, M. Goldberg, M. Hamer, W. E. Hooftman, I. L. Houtman, M. Joensuu, M. Jokela, F. Kittel, A. Knutsson, M. Koskenvuo, A. Koskinen, A. Kouvonen, M. Kumari, I. E. Madsen, M. G. Marmot, M. L. Nielsen, M. Nordin, T. Oksanen, J. Pentti, R. Rugulies, P. Salo, J. Siegrist, A. Singh-Manoux, S. B. Suominen, A. Vaananen, J. Vahtera, M. Virtanen, P. J. Westerholm, H. Westerlund, M. Zins, A. Steptoe, T. Theorell, and I. PD-Work Consortium. 2012. 'Job strain as a risk factor for coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of individual participant data', *Lancet*, 380: 1491-7.

Kloner, R. A., K. S. King, and M. G. Harrington. 2018. 'No-reflow phenomenon in the heart and brain', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 315: H550-H62.

Krause, T., K. Werner, J. B. Fiebach, K. Villringer, S. K. Piper, K. G. Haeusler, M. Endres, J. F. Scheitz, and C. H. Nolte. 2017. 'Stroke in right dorsal anterior insular cortex Is related to myocardial injury', *Ann Neurol*, 81: 502-11.

Krieg, A. J., E. B. Rankin, D. Chan, O. Razorenova, S. Fernandez, and A. J. Giaccia. 2010. 'Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia-inducible factor 1 alpha enhances hypoxic gene expression and tumor growth', *Mol Cell Biol*, 30: 344-53.

Kubota, Y., H. Iso, K. Yamagishi, N. Sawada, S. Tsugane, and Jphc Study Group. 2017. 'Daily Total Physical Activity and Incident Stroke: The Japan Public Health Center-Based Prospective Study', *Stroke*, 48: 1730-36.

Kumas, M., O. Altintas, E. Karatas, and A. Kocyigit. 2017. 'Protective Effect of Ischemic Preconditioning on Myocardium Against Remote Tissue Injury Following Transient Focal Cerebral Ischemia in Diabetic Rats', *Arq Bras Cardiol*, 109: 516-26.

Kunutsor, S. K., H. Khan, F. Zaccardi, T. Laukkanen, P. Willeit, and J. A. Laukkanen. 2018. 'Sauna bathing reduces the risk of stroke in Finnish men and women: A prospective cohort study', *Neurology*, 90: e1937-e44.

Laowattana, S., and S. M. Oppenheimer. 2007. 'Protective effects of beta-blockers in cerebrovascular disease', *Neurology*, 68: 509-14.

Laowattana, S., S. L. Zeger, J. A. Lima, S. N. Goodman, I. S. Wittstein, and S. M. Oppenheimer. 2006. 'Left insular stroke is associated with adverse cardiac outcome', *Neurology*, 66: 477-83; discussion 63.

Law, M. R., J. K. Morris, and N. J. Wald. 2009. 'Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies', *BMJ*, 338: b1665.

Lawton, L. N., M. F. Bonaldo, P. C. Jelenc, L. Qiu, S. A. Baumes, R. A. Marcelino, G. M. de Jesus, S. Wellington, J. A. Knowles, D. Warburton, S. Brown, and M. B. Soares. 1997. 'Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta', *Gene*, 203: 17-26.

Lecour, S. 2009. 'Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?', *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 47: 32-40.

Lee, D. C., R. R. Pate, C. J. Lavie, X. Sui, T. S. Church, and S. N. Blair. 2014. 'Leisure-time running reduces all-cause and cardiovascular mortality risk', *J Am Coll Cardiol*, 64: 472-81.

Lee, J. S., P. C. Oh, and K. K. Koh. 2016. 'Acute ischemic stroke mimicking acute coronary syndrome', *Int J Cardiol*, 221: 560-1.

Leonardi-Bee, J., P. M. Bath, S. J. Phillips, P. A. Sandercock, and I. S. T. Collaborative Group. 2002. 'Blood pressure and clinical outcomes in the International Stroke Trial', *Stroke*, 33: 1315-20.

Lewington, S., R. Clarke, N. Qizilbash, R. Peto, R. Collins, and Collaboration Prospective Studies. 2002. 'Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies', *Lancet*, 360: 1903-13.

Li, P. X., J. Wong, A. Ayed, D. Ngo, A. M. Brade, C. Arrowsmith, R. C. Austin, and H. J. Klamut. 2000. 'Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression', *Journal of Biological Chemistry*, 275: 20127-35.

Li, Z., H. Zhang, Y. Chen, L. Fan, and J. Fang. 2012. 'Forkhead transcription factor FOXO3a protein activates nuclear factor kappaB through B-cell lymphoma/leukemia 10 (BCL10) protein and promotes tumor cell survival in serum deprivation', *Journal of Biological Chemistry*, 287: 17737-45.

Lin, J. F., S. Wu, S. Y. Hsu, K. H. Yeh, H. H. Chou, S. T. Cheng, T. Y. Wu, W. T. Hsu, C. C. Yang, and Y. L. Ko. 2014. 'Growth-differentiation factor-15 and major cardiac events', *Am J Med Sci*, 347: 305-11.

Lind, L., A. Siegbahn, B. Lindahl, M. Stenemo, J. Sundstrom, and J. Arnlov. 2015. 'Discovery of New Risk Markers for Ischemic Stroke Using a Novel Targeted Proteomics Chip', *Stroke*, 46: 3340-7.

Lind, L., L. Wallentin, T. Kempf, H. Tapken, A. Quint, B. Lindahl, S. Olofsson, P. Venge, A. Larsson, J. Hulthe, A. Elmgren, and K. C. Wollert. 2009. 'Growth-differentiation factor-15 is an independent marker of cardiovascular dysfunction and disease in the elderly: results from the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) Study', *Eur Heart J*, 30: 2346-53.

Lindholm, D., E. Hagstrom, S. K. James, R. C. Becker, C. P. Cannon, A. Himmelmann, H. A. Katus, G. Maurer, J. L. Lopez-Sendon, P. G. Steg, R. F. Storey, A. Siegbahn, and L. Wallentin. 2017. 'Growth Differentiation Factor 15 at 1 Month After an Acute Coronary Syndrome Is Associated With Increased Risk of Major Bleeding', *J Am Heart Assoc*, 6.

Longa, E. Z., P. R. Weinstein, S. Carlson, and R. Cummins. 1989. 'Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats', *Stroke*, 20: 84-91.

Madsen, T. E., J. C. Khoury, K. A. Alwell, C. J. Moomaw, S. L. Demel, M. L. Flaherty, D. Woo, J. Mackey, F. De Los Rios La Rosa, S. Martini, S. Ferioli, O. Adeoye, P. Khatri, B. M. Kissela, and D. Kleindorfer. 2018. 'Sex differences in cardiovascular risk profiles of ischemic stroke patients with diabetes in the Greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study', *J Diabetes*, 10: 496-501.

Mannino, M., S. Asciutto, V. Terruso, M. Gammino, M. G. Cellura, and S. Monaco. 2017. 'Myocardial Infarction Following Intravenous Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke: Case Report and Literature Review', *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 26: e105-e07.

McBride, D. W., and J. H. Zhang. 2017. 'Precision Stroke Animal Models: the Permanent MCAO Model Should Be the Primary Model, Not Transient MCAO', *Transl Stroke Res*.

Merghani, A., A. Malhotra, and S. Sharma. 2016. 'The U-shaped relationship between exercise and cardiac morbidity', *Trends Cardiovasc Med*, 26: 232-40.

Meschia, J. F., C. Bushnell, B. Boden-Albala, L. T. Braun, D. M. Bravata, S. Chaturvedi, M. A. Creager, R. H. Eckel, M. S. Elkind, M. Fornage, L. B. Goldstein, S. M. Greenberg, S. E. Horvath, C. Iadecola, E. C. Jauch, W. S. Moore, J. A. Wilson, Council American Heart Association Stroke, Cardiovascular Council on, Nursing Stroke, Cardiology Council on Clinical, Genomics Council on Functional, Biology Translational, and Hypertension Council on. 2014. 'Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 45: 3754-832.

Miao, L., R. X. Yin, S. Yang, F. Huang, W. X. Chen, and X. L. Cao. 2017. 'Association between single nucleotide polymorphism rs9534275 and the risk of coronary artery disease and ischemic stroke', *Lipids Health Dis*, 16: 193.

Micheli, S., G. Agnelli, V. Caso, A. Alberti, F. Palmerini, M. Venti, and M. Paciaroni. 2012. 'Acute myocardial infarction and heart failure in acute stroke patients: frequency and influence on clinical outcome', *J Neurol*, 259: 106-10.

Michetti, F., N. D'Ambrosi, A. Toesca, M. A. Puglisi, A. Serrano, E. Marchese, V. Corvino, and M. C. Geloso. 2019. 'The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury', *J Neurochem*, 148: 168-87.

Min, J., M. U. Farooq, E. Greenberg, F. Aloka, A. Bhatt, M. Kassab, J. P. Morgan, and A. Majid. 2009. 'Cardiac dysfunction after left permanent cerebral focal ischemia: the brain and heart connection', *Stroke*, 40: 2560-3.

Mochmann, H. C., J. F. Scheitz, G. C. Petzold, K. G. Haeusler, H. J. Audebert, U. Laufs, C. Schneider, U. Landmesser, N. Werner, M. Endres, B. Witzenbichler, C. H. Nolte, and Trelas Study Group. 2016. 'Coronary Angiographic Findings in Acute Ischemic Stroke Patients With Elevated Cardiac Troponin: The Troponin Elevation in Acute Ischemic Stroke (TRELAS) Study', *Circulation*, 133: 1264-71.

Monbailliu, T., J. Goossens, and S. Hachimi-Idrissi. 2017. 'Blood protein biomarkers as diagnostic tool for ischemic stroke: a systematic review', *Biomark Med*, 11: 503-12.

Moore, A. G., D. A. Brown, W. D. Fairlie, A. R. Bauskin, P. K. Brown, M. L. Munier, P. K. Russell, L. A. Salamonsen, E. M. Wallace, and S. N. Breit. 2000. 'The transforming growth factor-ss superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women', *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 4781-8.

Mortensen, J. K., K. L. Kraglund, S. P. Johnsen, O. Mors, G. Andersen, and H. N. Buttenschon. 2018. 'The Serotonin Transporter Gene Polymorphisms and Risk of Ischemic Stroke', *Cerebrovasc Dis*, 45: 187-92.

Mracsko, E., A. Liesz, S. Karcher, M. Zorn, F. Bari, and R. Veltkamp. 2014. 'Differential effects of sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis on systemic immune cells after severe experimental stroke', *Brain Behav Immun*, 41: 200-9.

Mullican, S. E., X. Lin-Schmidt, C. N. Chin, J. A. Chavez, J. L. Furman, A. A. Armstrong, S. C. Beck, V. J. South, T. Q. Dinh, T. D. Cash-Mason, C. R. Cavanaugh, S. Nelson, C. Huang, M. J. Hunter, and S. M. Rangwala. 2017. 'GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates', *Nat Med*, 23: 1150-57.

Murry, C. E., R. B. Jennings, and K. A. Reimer. 1986. 'Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium', *Circulation*, 74: 1124-36.

Nguyen, T. T., R. D. Ellefson, D. O. Hodge, K. R. Bailey, T. E. Kottke, and H. S. Abu-Lebdeh. 1997. 'Predictive value of electrophoretically detected lipoprotein(a) for coronary heart disease and cerebrovascular disease in a community-based cohort of 9936 men and women', *Circulation*, 96: 1390-7.

Nogueira, R. G., A. P. Jadhav, D. C. Haussen, A. Bonafe, R. F. Budzik, P. Bhuva, D. R. Yavagal, M. Ribo, C. Cognard, R. A. Hanel, C. A. Sila, A. E. Hassan, M. Millan, E. I.

Levy, P. Mitchell, M. Chen, J. D. English, Q. A. Shah, F. L. Silver, V. M. Pereira, B. P. Mehta, B. W. Baxter, M. G. Abraham, P. Cardona, E. Veznedaroglu, F. R. Hellinger, L. Feng, J. F. Kirmani, D. K. Lopes, B. T. Jankowitz, M. R. Frankel, V. Costalat, N. A. Vora, A. J. Yoo, A. M. Malik, A. J. Furlan, M. Rubiera, A. Aghaebrahim, J. M. Olivot, W. G. Tekle, R. Shields, T. Graves, R. J. Lewis, W. S. Smith, D. S. Liebeskind, J. L. Saver, T. G. Jovin, and Dawn Trial Investigators. 2018. 'Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct', *N Engl J Med*, 378: 11-21.

O'Donnell, M. J., D. Xavier, L. Liu, H. Zhang, S. L. Chin, P. Rao-Melacini, S. Rangarajan, S. Islam, P. Pais, M. J. McQueen, C. Mondo, A. Damasceno, P. Lopez-Jaramillo, G. J. Hankey, A. L. Dans, K. Yusoff, T. Truelsen, H. C. Diener, R. L. Sacco, D. Ryglewicz, A. Czlonkowska, C. Weimar, X. Wang, S. Yusuf, and Interstroke investigators. 2010. 'Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study', *Lancet*, 376: 112-23.

Olesen, K. K. W., M. Madsen, G. Y. H. Lip, G. Egholm, T. Thim, L. O. Jensen, B. Raungaard, J. C. Nielsen, H. E. Botker, H. T. Sorensen, and M. Maeng. 2017. 'Coronary artery disease and risk of adverse cardiac events and stroke', *Eur J Clin Invest*, 47: 819-28.

Olsen, O. E., A. Skjaervik, B. F. Stordal, A. Sundan, and T. Holien. 2017. 'TGF-beta contamination of purified recombinant GDF15', *PLoS One*, 12: e0187349.

Oppenheimer, S., and D. Cechetto. 2016. 'The Insular Cortex and the Regulation of Cardiac Function', *Compr Physiol*, 6: 1081-133.

Oppenheimer, S. M., A. Gelb, J. P. Girvin, and V. C. Hachinski. 1992. 'Cardiovascular effects of human insular cortex stimulation', *Neurology*, 42: 1727-32.

Oppenheimer, S. M., J. X. Wilson, C. Guiraudon, and D. F. Cechetto. 1991. 'Insular cortex stimulation produces lethal cardiac arrhythmias: a mechanism of sudden death?', *Brain Res*, 550: 115-21.

Orgah, J. O., J. Yu, T. Zhao, L. Wang, M. Yang, Y. Zhang, G. Fan, and Y. Zhu. 2018. 'Danhong Injection Reversed Cardiac Abnormality in Brain-Heart Syndrome via Local and Remote beta-Adrenergic Receptor Signaling', *Front Pharmacol*, 9: 692.

Ostir, G. V., K. S. Markides, M. K. Peek, and J. S. Goodwin. 2001. 'The association between emotional well-being and the incidence of stroke in older adults', *Psychosom Med*, 63: 210-5.

Park, H. K., B. J. Kim, M. K. Han, J. M. Park, K. Kang, S. J. Lee, J. G. Kim, J. K. Cha, D. H. Kim, H. W. Nah, T. H. Park, S. S. Park, K. B. Lee, J. Lee, K. S. Hong, Y. J. Cho, B. C. Lee, K. H. Yu, M. S. Oh, J. T. Kim, K. H. Choi, D. E. Kim, W. S. Ryu, J. C. Choi, S. Johansson, S. J. Lee, W. H. Lee, J. S. Lee, J. Lee, H. J. Bae, and Crcs- K. Investigators. 2017. 'One-Year Outcomes After Minor Stroke or High-Risk Transient Ischemic Attack: Korean Multicenter Stroke Registry Analysis', *Stroke*, 48: 2991-98.

Peter, R., J. Siegrist, J. Hallqvist, C. Reuterwall, T. Theorell, and Sheep Study Group. 2002. 'Psychosocial work environment and myocardial infarction: improving risk estimation by combining two complementary job stress models in the SHEEP Study', *J Epidemiol Community Health*, 56: 294-300.

Piek, E., C. H. Heldin, and P. Ten Dijke. 1999. 'Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling', *FASEB J*, 13: 2105-24.

Planavila, A., J. Fernandez-Sola, and F. Villarroya. 2017. 'Cardiokines as Modulators of Stress-Induced Cardiac Disorders', *Adv Protein Chem Struct Biol*, 108: 227-56.

Ponnaluri, V. K., R. K. Vadlapatla, D. T. Vavilala, D. Pal, A. K. Mitra, and M. Mukherji. 2011. 'Hypoxia induced expression of histone lysine demethylases: implications in oxygen-dependent retinal neovascular diseases', *Biochem Biophys Res Commun*, 415: 373-7.

Powers, W. J., A. A. Rabinstein, T. Ackerson, O. M. Adeoye, N. C. Bambakidis, K. Becker, J. Biller, M. Brown, B. M. Demaerschalk, B. Hoh, E. C. Jauch, C. S. Kidwell, T. M. Leslie-Mazwi, B. Ovbiagele, P. A. Scott, K. N. Sheth, A. M. Southerland, D. V. Summers, D. L. Tirschwell, and Council American Heart Association Stroke. 2018. '2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association', *Stroke*, 49: e46-e110.

Preusch, M. R., M. Baeuerle, C. Albrecht, E. Blessing, M. Bischof, H. A. Katus, and F. Bea. 2013. 'GDF-15 protects from macrophage accumulation in a mousemodel of advanced atherosclerosis', *Eur J Med Res*, 18: 19.

Prosser, J., L. MacGregor, K. R. Lees, H. C. Diener, W. Hacke, S. Davis, and Vista Investigators. 2007. 'Predictors of early cardiac morbidity and mortality after ischemic stroke', *Stroke*, 38: 2295-302.

Przyklenk, K., B. Bauer, M. Ovize, R. A. Kloner, and P. Whittaker. 1993. 'Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion', *Circulation*, 87: 893-9.

Reinholdsson, M., A. Palstam, and K. S. Sunnerhagen. 2018. 'Prestroke physical activity could influence acute stroke severity (part of PAPSIGOT)', *Neurology*, 91: e1461-e67.

Ripoll, J. G., J. L. Blackshear, and J. L. Diaz-Gomez. 2018. 'Acute Cardiac Complications in Critical Brain Disease', *Neurosurg Clin N Am*, 29: 281-97.

Rochette, L., M. Zeller, Y. Cottin, and C. Vergely. 2015. 'Growth and differentiation factor 11 (GDF11): Functions in the regulation of erythropoiesis and cardiac regeneration', *Pharmacol Ther*, 156: 26-33.

Rohatgi, A., P. Patel, S. R. Das, C. R. Ayers, A. Khera, A. Martinez-Rumayor, J. D. Berry, D. K. McGuire, and J. A. de Lemos. 2012. 'Association of growth differentiation factor-15 with coronary atherosclerosis and mortality in a young, multiethnic population: observations from the Dallas Heart Study', *Clin Chem*, 58: 172-82.

Rosenberg, J. H., J. H. Werner, M. J. Moulton, and D. K. Agrawal. 2018. 'Current Modalities and Mechanisms Underlying Cardioprotection by Ischemic Conditioning', *J Cardiovasc Transl Res*, 11: 292-307.

Santhanakrishnan, R., J. P. Chong, T. P. Ng, L. H. Ling, D. Sim, K. T. Leong, P. S. Yeo, H. Y. Ong, F. Jaufeerally, R. Wong, P. Chai, A. F. Low, A. M. Richards, and C. S. Lam. 2012. 'Growth differentiation factor 15, ST2, high-sensitivity troponin T, and N-terminal pro brain natriuretic peptide in heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction', *Eur J Heart Fail*, 14: 1338-47.

Schernthaner, C., M. Lichtenauer, B. Wernly, V. Paar, R. Pistulli, I. Rohm, C. Jung, H. R. Figulla, A. Yilmaz, J. Cadamuro, E. Haschke-Becher, J. Pernow, P. C. Schulze, U. C. Hoppe, and D. Kretzschmar. 2017. 'Multibiomarker analysis in patients with acute myocardial infarction', *Eur J Clin Invest*, 47: 638-48.

Schindowski, K., O. von Bohlen und Halbach, J. Strelau, D. A. Ridder, O. Herrmann, A. Schober, M. Schwaninger, and K. Unsicker. 2011. 'Regulation of GDF-15, a distant TGF-beta superfamily member, in a mouse model of cerebral ischemia', *Cell Tissue Res*, 343: 399-409.

Schlittenhardt, D., A. Schober, J. Strelau, G. A. Bonaterra, W. Schmiedt, K. Unsicker, J. Metz, and R. Kinscherf. 2004. 'Involvement of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in oxLDL-induced apoptosis of human macrophages in vitro and in arteriosclerotic lesions', *Cell Tissue Res*, 318: 325-33.

Schmidt, M. R., M. Smerup, I. E. Konstantinov, M. Shimizu, J. Li, M. Cheung, P. A. White, S. B. Kristiansen, K. Sorensen, V. Dzavik, A. N. Redington, and R. K. Kharbanda. 2007. 'Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic perconditioning', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292: H1883-90.

Schober, A., M. Bottner, J. Strelau, R. Kinscherf, G. A. Bonaterra, M. Barth, L. Schilling, W. D. Fairlie, S. N. Breit, and K. Unsicker. 2001. 'Expression of growth differentiation factor-15/ macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in the perinatal, adult, and injured rat brain', *J Comp Neurol*, 439: 32-45.

Schulman, D., D. S. Latchman, and D. M. Yellon. 2002. 'Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283: H1481-8.

Schwartz, G. G., A. G. Olsson, M. D. Ezekowitz, P. Ganz, M. F. Oliver, D. Waters, A. Zeiher, B. R. Chaitman, S. Leslie, T. Stern, and Investigators Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering Study. 2001. 'Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial', *Jama*, 285: 1711-8.

Seifert-Held, T., T. Pekar, T. Gattringer, N. E. Simmet, H. Scharnagl, T. Stojakovic, F. Fazekas, and M. K. Storch. 2011. 'Circulating Dickkopf-1 in acute ischemic stroke and clinically stable cerebrovascular disease', *Atherosclerosis*, 218: 233-7.

Shah, R. S., and J. W. Cole. 2010. 'Smoking and stroke: the more you smoke the more you stroke', *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 8: 917-32.

Sifat, A. E., B. Vaidya, H. Villalba, T. H. Albekairi, and T. J. Abbruscato. 2018. 'Neurovascular unit transport responses to ischemia and common coexisting conditions: smoking and diabetes', *Am J Physiol Cell Physiol*.

Skau, E., E. Henriksen, P. Wagner, P. Hedberg, A. Siegbahn, and J. Leppert. 2017. 'GDF-15 and TRAIL-R2 are powerful predictors of long-term mortality in patients with acute myocardial infarction', *Eur J Prev Cardiol*, 24: 1576-83.

Song, H., D. Yin, and Z. Liu. 2012. 'GDF-15 promotes angiogenesis through modulating p53/HIF-1alpha signaling pathway in hypoxic human umbilical vein endothelial cells', *Mol Biol Rep*, 39: 4017-22.

Sposato, L. A., G. Cohen, J. M. Wardlaw, P. Sandercock, R. I. Lindley, V. Hachinski, I. S. T. Expert Reading Panel, and I. S. T. Collaborative Group the. 2016. 'Effect of Right Insular Involvement on Death and Functional Outcome After Acute Ischemic Stroke in the IST-3 Trial (Third International Stroke Trial)', *Stroke*, 47: 2959-65.

Stewart, R. A. H., C. Held, N. Hadziosmanovic, P. W. Armstrong, C. P. Cannon, C. B. Granger, E. Hagstrom, J. S. Hochman, W. Koenig, E. Lonn, J. C. Nicolau, P. G. Steg, O. Vedin, L. Wallentin, H. D. White, and Stability Investigators. 2017. 'Physical Activity and Mortality in Patients With Stable Coronary Heart Disease', *J Am Coll Cardiol*, 70: 1689-700.

Strelau, J., A. Sullivan, M. Bottner, P. Lingor, E. Falkenstein, C. Suter-Crazzolara, D. Galter, J. Jaszai, K. Krieglstein, and K. Unsicker. 2000. 'Growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 is a novel trophic factor for midbrain dopaminergic neurons in vivo', *J Neurosci*, 20: 8597-603.

Sturm, V. E., J. A. Brown, A. Y. Hua, S. J. Lwi, J. Zhou, F. Kurth, S. B. Eickhoff, H. J. Rosen, J. H. Kramer, B. L. Miller, R. W. Levenson, and W. W. Seeley. 2018. 'Network Architecture Underlying Basal Autonomic Outflow: Evidence from Frontotemporal Dementia', *J Neurosci*, 38: 8943-55.

Suleiman, H. M., I. S. Aliyu, S. A. Abubakar, M. S. Isa, J. M. El-Bashir, R. Adamu, M. Z. Ibrahim, A. Mohammed, R. Yusuf, M. Manu, A. B. Dogara, S. K. Mustapha, N. Bello, and S. A. Ozovehe. 2017. 'Cardiac Troponin T and creatine kinase MB fraction levels among patients with acute ischemic stroke in Nigeria', *Niger J Clin Pract*, 20: 1618-21.

Sun, L., J. Ai, N. Wang, R. Zhang, J. Li, T. Zhang, W. Wu, P. Hang, Y. Lu, and B. Yang. 2010. 'Cerebral ischemia elicits aberration in myocardium contractile function and intracellular calcium handling', *Cell Physiol Biochem*, 26: 421-30.

Sun, L., J. Du, G. Zhang, Y. Zhang, G. Pan, L. Wang, and B. Yang. 2008. 'Aberration of L-type calcium channel in cardiac myocytes is one of the mechanisms of arrhythmia induced by cerebral ischemia', *Cell Physiol Biochem*, 22: 147-56.

Sun, L., X. Zhou, J. Jiang, X. Zang, X. Chen, H. Li, H. Cao, and Q. Wang. 2018. 'Growth differentiation factor-15 levels and the risk of contrast induced acute kidney injury in acute myocardial infarction patients treated invasively: A propensity-score match analysis', *PLoS One*, 13: e0194152.

Sun, M. S., H. Jin, X. Sun, S. Huang, F. L. Zhang, Z. N. Guo, and Y. Yang. 2018. 'Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy', *Oxid Med Cell Longev*, 2018: 3804979.

Suwaidi, J. A., R. S. Wright, J. P. Grill, D. D. Hensrud, J. G. Murphy, R. W. Squires, and S. L. Kopecky. 2001. 'Obesity is associated with premature occurrence of acute myocardial infarction', *Clin Cardiol*, 24: 542-7.

Tagawa, M., S. Takeuchi, Y. Nakamura, M. Saeki, Y. Taniguchi, T. Ohno, H. Watanabe, Y. Ochiai, K. Kato, M. Chinushi, and Y. Aizawa. 2019. 'Asymptomatic Coronary Artery Disease in Japanese Patients With the Acute Ischemic Stroke', *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 28: 612-18.

Tawakol, A., A. Ishai, R. A. Takx, A. L. Figueroa, A. Ali, Y. Kaiser, Q. A. Truong, C. J. Solomon, C. Calcagno, V. Mani, C. Y. Tang, W. J. Mulder, J. W. Murrough, U.

Hoffmann, M. Nahrendorf, L. M. Shin, Z. A. Fayad, and R. K. Pitman. 2017. 'Relation between resting amygdalar activity and cardiovascular events: a longitudinal and cohort study', *Lancet*, 389: 834-45.

Toell, T., C. Boehme, L. Mayer, S. Krebs, C. Lang, K. Willeit, B. Prantl, M. Knoflach, G. Rumpold, G. Schoenherr, A. Griesmacher, P. Willeit, J. Ferrari, W. Lang, S. Kiechl, and J. Willeit. 2018. 'Pragmatic trial of multifaceted intervention (STROKE-CARD care) to reduce cardiovascular risk and improve quality-of-life after ischaemic stroke and transient ischaemic attack -study protocol', *BMC Neurol*, 18: 187.

Tokushige, A., M. Miyata, T. Sonoda, I. Kosedo, D. Kanda, T. Takumi, Y. Kumagae, Y. Fukukura, and M. Ohishi. 2018. 'Prospective Study on the Incidence of Cerebrovascular Disease After Coronary Angiography', *J Atheroscler Thromb*, 25: 224-32.

Tolstrup, J. S., U. A. Hvidtfeldt, E. M. Flachs, D. Spiegelman, B. L. Heitmann, K. Balter, U. Goldbourt, G. Hallmans, P. Knekt, S. Liu, M. Pereira, J. Stevens, J. Virtamo, and D. Feskanich. 2014. 'Smoking and risk of coronary heart disease in younger, middle-aged, and older adults', *Am J Public Health*, 104: 96-102.

Touze, E., O. Varenne, G. Chatellier, S. Peyrard, P. M. Rothwell, and J. L. Mas. 2005. 'Risk of myocardial infarction and vascular death after transient ischemic attack and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis', *Stroke*, 36: 2748-55.

Tsai, V. W. W., Y. Husaini, A. Sainsbury, D. A. Brown, and S. N. Breit. 2018. 'The MIC-1/GDF15-GFRAL Pathway in Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Cachexia, and Other Associated Diseases', *Cell Metab*, 28: 353-68.

Tsuji, A., K. Sakurai, E. Kiyokage, T. Yamazaki, S. Koide, K. Toida, K. Ishimura, and Y. Matsuda. 2003. 'Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. Potential role of PACE4 in the activation of proproteins in the extracellular matrix', *Biochim Biophys Acta*, 1645: 95-104.

Turnbull, F., and Collaboration Blood Pressure Lowering Treatment Trialists. 2003. 'Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials', *Lancet*, 362: 1527-35.

Veltkamp, R., S. Uhlmann, M. Marinescu, C. Sticht, D. Finke, N. Gretz, H. J. Grone, H. A. Katus, J. Backs, and L. H. Lehmann. 2019. 'Experimental ischaemic stroke induces transient cardiac atrophy and dysfunction', *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 10: 54-62.

Wakili, R., N. Voigt, S. Kaab, D. Dobrev, and S. Nattel. 2011. 'Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation', *Journal of Clinical Investigation*, 121: 2955-68.

Wallentin, L., Z. Hijazi, U. Andersson, J. H. Alexander, R. De Caterina, M. Hanna, J. D. Horowitz, E. M. Hylek, R. D. Lopes, S. Asberg, C. B. Granger, A. Siegbahn, and Aristotle Investigators. 2014. 'Growth differentiation factor 15, a marker of oxidative stress and inflammation, for risk assessment in patients with atrial fibrillation: insights from the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) trial', *Circulation*, 130: 1847-58.

Wallentin, L., B. Zethelius, L. Berglund, K. M. Eggers, L. Lind, B. Lindahl, K. C. Wollert, and A. Siegbahn. 2013. 'GDF-15 for prognostication of cardiovascular and cancer morbidity and mortality in men', *PLoS One*, 8: e78797.

Wang, L., L. Sun, Y. Zhang, H. Wu, C. Li, Z. Pan, Y. Lu, and B. Yang. 2009. 'Ionic mechanisms underlying action potential prolongation by focal cerebral ischemia in rat ventricular myocytes', *Cell Physiol Biochem*, 23: 305-16.

Wang, R., Y. Y. Liu, X. Y. Liu, S. W. Jia, J. Zhao, D. Cui, and L. Wang. 2014. 'Resveratrol protects neurons and the myocardium by reducing oxidative stress and ameliorating mitochondria damage in a cerebral ischemia rat model', *Cell Physiol Biochem*, 34: 854-64.

Wang, W., C. Shen, H. Zhao, W. Tang, S. Yang, J. Li, Z. Ren, and Y. Zhao. 2018. 'A prospective study of the hypertriglyceridemic waist phenotype and risk of incident ischemic stroke in a Chinese rural population', *Acta Neurol Scand*, 138: 156-62.

Wang, X., L. Zhu, Y. Wu, K. Sun, M. Su, L. Yu, J. Chen, W. Li, J. Yang, Z. Yuan, and R. Hui. 2016. 'Plasma growth differentiation factor 15 predicts first-ever stroke in hypertensive patients', *Medicine (Baltimore)*, 95: e4342.

Wang, Y. Y., S. Y. Lin, Y. H. Chuang, W. H. Sheu, K. C. Tung, and C. J. Chen. 2014. 'Activation of hepatic inflammatory pathways by catecholamines is associated with hepatic insulin resistance in male ischemic stroke rats', *Endocrinology*, 155: 1235-46.

Wannamethee, G., and A. G. Shaper. 1990. 'Weight change in middle-aged British men: implications for health', *Eur J Clin Nutr*, 44: 133-42.

Weinbrenner, C., G. S. Liu, J. M. Downey, and M. V. Cohen. 1998. 'Cyclosporine A limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia', *Cardiovascular Research*, 38: 676-84.

Wiklund, F. E., A. M. Bennet, P. K. Magnusson, U. K. Eriksson, F. Lindmark, L. Wu, N. Yaghoutyfam, C. P. Marquis, P. Stattin, N. L. Pedersen, H. O. Adami, H. Gronberg, S. N. Breit, and D. A. Brown. 2010. 'Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15): a new marker of all-cause mortality', *Aging Cell*, 9: 1057-64.

Wira, C. R., 3rd, E. Rivers, C. Martinez-Capolino, B. Silver, G. Iyer, R. Sherwin, and C. Lewandowski. 2011. 'Cardiac complications in acute ischemic stroke', *West J Emerg Med*, 12: 414-20.

Wira, C. R., 3rd, E. Rivers, B. Silver, and C. Lewandowski. 2011. 'The impact of cardiac contractility on cerebral blood flow in ischemia', *West J Emerg Med*, 12: 227-32.

Wolf, P. A. 1998. 'Prevention of stroke', *Lancet*, 352 Suppl 3: SIII15-8.

Wollert, K. C., T. Kempf, B. Lagerqvist, B. Lindahl, S. Olofsson, T. Allhoff, T. Peter, A. Siegbahn, P. Venge, H. Drexler, and L. Wallentin. 2007. 'Growth differentiation factor 15 for risk stratification and selection of an invasive treatment strategy in non ST-elevation acute coronary syndrome', *Circulation*, 116: 1540-8.

Wollert, K. C., T. Kempf, T. Peter, S. Olofsson, S. James, N. Johnston, B. Lindahl, R. Horn-Wichmann, G. Brabant, M. L. Simoons, P. W. Armstrong, R. M. Califf, H. Drexler, and L. Wallentin. 2007. 'Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome', *Circulation*, 115: 962-71.

Worthmann, H., T. Kempf, C. Widera, A. B. Tryc, A. Goldbecker, Y. T. Ma, M. Deb, A. Tountopoulou, J. Lambrecht, M. Heeren, R. Lichtinghagen, K. C. Wollert, and K.

Weissenborn. 2011. 'Growth differentiation factor 15 plasma levels and outcome after ischemic stroke', *Cerebrovasc Dis*, 32: 72-8.

Writing Group, Members, D. Mozaffarian, E. J. Benjamin, A. S. Go, D. K. Arnett, M. J. Blaha, M. Cushman, S. R. Das, S. de Ferranti, J. P. Despres, H. J. Fullerton, V. J. Howard, M. D. Huffman, C. R. Isasi, M. C. Jimenez, S. E. Judd, B. M. Kissela, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, S. Liu, R. H. Mackey, D. J. Magid, D. K. McGuire, E. R. Mohler, 3rd, C. S. Moy, P. Muntner, M. E. Mussolino, K. Nasir, R. W. Neumar, G. Nichol, L. Palaniappan, D. K. Pandey, M. J. Reeves, C. J. Rodriguez, W. Rosamond, P. D. Sorlie, J. Stein, A. Towfighi, T. N. Turan, S. S. Virani, D. Woo, R. W. Yeh, M. B. Turner, Committee American Heart Association Statistics, and Subcommittee Stroke Statistics. 2016. 'Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association', *Circulation*, 133: e38-360.

Xiang, Y., T. Zhang, J. Guo, Y. F. Peng, and Y. S. Wei. 2017. 'The Association of Growth Differentiation Factor-15 Gene Polymorphisms with Growth Differentiation Factor-15 Serum Levels and Risk of Ischemic Stroke', *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 26: 2111-19.

Yang, L., C. C. Chang, Z. Sun, D. Madsen, H. Zhu, S. B. Padkjaer, X. Wu, T. Huang, K. Hultman, S. J. Paulsen, J. Wang, A. Bugge, J. B. Frantzen, P. Norgaard, J. F. Jeppesen, Z. Yang, A. Secher, H. Chen, X. Li, L. M. John, B. Shan, Z. He, X. Gao, J. Su, K. T. Hansen, W. Yang, and S. B. Jorgensen. 2017. 'GFRAL is the receptor for GDF15 and is required for the anti-obesity effects of the ligand', *Nat Med*, 23: 1158-66.

Yasukochi, Y., J. Sakuma, I. Takeuchi, K. Kato, M. Oguri, T. Fujimaki, H. Horibe, and Y. Yamada. 2018. 'Six novel susceptibility loci for coronary artery disease and cerebral infarction identified by longitudinal exome-wide association studies in a Japanese population', *Biomed Rep*, 9: 123-34.

Yildiz, Z., A. Kocer, S. Avsar, and G. Cinier. 2018. 'Is Troponin Really a Reliable Marker in Patients with Acute Ischemic Stroke?', *Rom J Intern Med*.

Yoon, J. E., J. S. Sunwoo, J. S. Kim, H. Roh, M. Y. Ahn, H. Y. Woo, and K. B. Lee. 2017. 'Poststroke glycemic variability increased recurrent cardiovascular events in diabetic patients', *J Diabetes Complications*, 31: 390-94.

Young, L. H., C. M. Viscoli, J. P. Curtis, S. E. Inzucchi, G. G. Schwartz, A. M. Lovejoy, K. L. Furie, M. J. Gorman, R. Conwit, J. D. Abbott, D. L. Jacoby, D. M. Kolansky, S. E. Pfau, F. S. Ling, W. N. Kernan, and Iris Investigators. 2017. 'Cardiac Outcomes After Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack: Effects of Pioglitazone in Patients With Insulin Resistance Without Diabetes Mellitus', *Circulation*, 135: 1882-93.

Yousufuddin, M., N. Young, L. Keenan, T. Olson, J. Shultz, T. Doyle, E. M. Ahmmad, K. Arumaithurai, P. Takahashi, and M. H. Murad. 2018. 'Five-Year Mortality After Transient Ischemic Attack: Focus on Cardiometabolic Comorbidity and Hospital Readmission', *Stroke*, 49: 730-33.

Yu, O. H., H. Yin, and L. Azoulay. 2015. 'The combination of DPP-4 inhibitors versus sulfonylureas with metformin after failure of first-line treatment in the risk for major cardiovascular events and death', *Can J Diabetes*, 39: 383-9.

Yusuf, S., S. Hawken, S. Ounpuu, T. Dans, A. Avezum, F. Lanas, M. McQueen, A. Budaj, P. Pais, J. Varigos, L. Lisheng, and Interheart Study Investigators. 2004. 'Effect of

potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study', *Lancet*, 364: 937-52.

Zhang, M., K. Pan, Q. Liu, X. Zhou, T. Jiang, and Y. Li. 2016. 'Growth differentiation factor 15 may protect the myocardium from noreflow by inhibiting the inflammatorylike response that predominantly involves neutrophil infiltration', *Mol Med Rep*, 13: 623-32.

Zhang, X., W. Zheng, T. Wang, P. Ren, F. Wang, X. Ma, J. Wang, and X. Huang. 2017. 'Danshen-Chuanxiong-Honghua Ameliorates Cerebral Impairment and Improves Spatial Cognitive Deficits after Transient Focal Ischemia and Identification of Active Compounds', *Front Pharmacol*, 8: 452.

Zhang, Y., L. A. Moszczynski, Q. Liu, J. Jiang, D. Zhao, D. Quan, T. Mele, V. McAlister, A. Jevnikar, S. J. Baek, K. Liu, and X. Zheng. 2017. 'Over-expression of growth differentiation factor 15 (GDF15) preventing cold ischemia reperfusion (I/R) injury in heart transplantation through Foxo3a signaling', *Oncotarget*, 8: 36531-44.

Zhang, Y., G. Zhang, Y. Liu, R. Chen, D. Zhao, V. McAlister, T. Mele, K. Liu, and X. Zheng. 2018. 'GDF15 Regulates Malat-1 Circular RNA and Inactivates NFkappaB Signaling Leading to Immune Tolerogenic DCs for Preventing Alloimmune Rejection in Heart Transplantation', *Front Immunol*, 9: 2407.

Zhou, S., W. Zhu, Y. Zhang, S. Pan, and J. Bao. 2018. 'S100B promotes microglia M1 polarization and migration to aggravate cerebral ischemia', *Inflamm Res*, 67: 937-49.

ANNEXES

I. Liste des communications scientifiques

1. Publications

- ✓ Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. 2019. The role of osteoprotegerin and its ligands in vascular function. *Int J Mol Sci*, 19.
- ✓ Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Malka G, Vergely C. 2018. Regenerative capacity of endogenous factor: growth differentiation factor 11; a new approach of the management of age-related cardiovascular events. *Int J Mol Sci*, 19.
- ✓ Meloux A, Rigal E, Rochette L, Cottin Y, Bejot Y, Vergely C. 2018. Ischemic stroke increases heart vulnerability to ischemia-reperfusion and alters myocardial cardioprotective pathways. *Stroke*, 49: 2752-2760.
- ✓ Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. 2018. The role of osteoprotegerin in the crosstalk between vessels and bone: Its potential utility as a marker of cardiometabolic diseases. *Pharmacol therap*, 182: 115-132.

2. Communications orales

- ✓ **2019 : Congrès du Printemps de la Cardiologie (Lille)**

  Méloux A, Rigal E, Porcherot I, Velin M, Dogon G, Cottin Y, Rochette L, Béjot Y, Vergely C. Ischemic stroke alters myocardial function and cardioprotective pathways: Potential involvement of GDF15. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 11 (2), 148 (p218-219)
- ✓ **2019 : Congrès du Printemps de la Cardiologie (Lille)**

  Garnier L, Méloux A, Graber M, Mouhat B, Béjot Y, Vergely C, Guenancia C. Pathophysiological mechanisms involved in the new onset of AF after stroke: Preliminary results from SAFAS study (Stepwise screening for silent Atrial Fibrillation After Stroke). *Arch. Cardiovasc. Dis.* 11 (2), 480 (p208)
- ✓ **2019 : Congrès du Printemps de la Cardiologie (Lille)**

  Rigal E, Greco C, Porcherot I, Méloux A, Rochette L, Vergely C. Long-term impact of postnatal nutritional programming on cardiac sensitivity to ischemia-reperfusion injury in vivo and on cardio-protective pathways in mice. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 11 (2), 147 (p218)
- ✓ **2019 : Congrès du Printemps de la Cardiologie (Lille)**

  Mouhat B, Guenancia C, Rigal E, Méloux A, Garnier L, Rochette L, Laine M, Cottin Y, Zeller M, Vergely C. New biomarkers associated with new-onset atrial fibrillation in acute myocardial infarction. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 11 (2), 446 (p239)

- ✓ **2018 : European Society of Cardiology (Munich)**

  Méloux A, Rigal E, Porcherot I, Rochette L, Cottin Y, Béjot Y, Vergely C. Post-ischemic stroke-induced myocardial dysfunction is associated with nitro-oxidative stress and sympathetic overactivity. *European heart journal,* 39 (1), 1203

- ✓ **2018 : Forum des Jeunes Chercheurs (Besançon)**

  Méloux A, Rigal E, Cottin Y, Rochette L, Béjot Y, Vergely C. Post-ischemic stroke-induced myocardial dysfunction is associated with nitro-oxidative stress and sympathetic overactivity.

- ✓ **2018 : Cardiovascular Research Meeting (Fribourg)**

  Méloux A, Rigal E, Porcherot I, Rochette L, Cottin Y, Béjot Y, Vergely C. Post-ischemic stroke-induced myocardial dysfunction is associated with nitro-oxidative stress and sympathetic overactivity.

- ✓ **2016 : European Society of Cardiology (Rome)**

  Méloux A, Rigal E, Merle L, Cellier L, Rochette L, Béjot Y, Vergely C. Experimental cerebral ischemia in rats increases myocardial vulnerability to ischemia reperfusion injury ex vivo. *European heart journal,* 37 (1), 3247 (p630)

- ✓ **2016 : Congrès du Printemps de la Cardiologie (Dijon)**

  Merle L, Rigal E, Cellier L, Méloux A, Rochette L, Béjot Y, Vergely C. Experimental cerebral ischemia in rats increases myocardial vulnerability to ischemia reperfusion injury ex vivo. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 8 (3), 197 (p110)

- ✓ **2015 : Congrès Hopipharm (Reims)**

  Riou S, Méloux A, Escapoulade L, Gaha K, Willemin JC, Hettler D. Bilan sur le plan biologique et médicamenteux de 18 mois d'hémodiafiltration. 12

3. Communications affichées

- ✓ **2019 : Congrès du Printemps de la Cardiologie (Lille)**

  Méloux A, Rochette L, Maza M, Bichat F, Beer JC, Chague F, Cottin Y, Zeller M, Vergely C. Growth differentiation factor 15 as an integrative biomarker of heart failure in patients with acute myocardial infarction. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 11 (2), 149 (p239-240)

- ✓ **2019 : Cardiovascular Research Meeting (Fribourg)**

  Méloux A, Rigal E, Rochette L, Cottin Y, Béjot Y, Vergely C. Ischemic stroke induces myocardial dysfunction and alters cardioprotective pathways: potential involvement of the cytokine GDF15?

- ✓ **2019 : Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie (Paris)**
  Méloux A, Rochette L, Maza M, Bichat F, Beer JC, Chague F, Cottin Y, Zeller M, Vergely C. Growth differentiation factor 15 as an integrative biomarker of heart failure in patients with acute myocardial infarction. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 11 (1), 345 (p45)
- ✓ **2019 : Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie (Paris)**
  Méloux A, Rigal E, Rochette L, Cottin Y, Béjot Y, Vergely C. Post-ischemic stroke-induced myocardial dysfunction is associated with nitro-oxidative stress and sympathetic overactivity. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 11 (1), 341 (p108)
- ✓ **2018 : Congrès du Printemps de la Cardiologie (Montpellier)**
  Méloux A, Brenière C, Garnier L, Laville A, Béjot Y, Vergely C. Growth differentiation factor 15 (GDF15) is a prognosis biomarker of sequelae handicap after the occurrence of an ischemic stroke. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 10 (2), 094 (p227)
- ✓ **2018 : Congrès du Printemps de la Cardiologie (Montpellier)**
  Rigal E, Greco C, Méloux A, Yzydorczyk C, Rochette L, Simeoni U, Vergely C. Long-term impact of postnatal overfeeding on myocardial protective pathways. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 10 (2), 089 (p188-189)
- ✓ **2018 : Congrès du Printemps de la Cardiologie (Montpellier)**
  Méloux A, Rigal E, Porcherot I, Mouhat B, Cottin Y, Rochette L, Béjot Y, Vergely C. Ischemic stroke induced myocardial dysfunction associated with nitro-oxidative stress and sympathetic overactivity. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 10 (2), 039 (p227)
- ✓ **2017 : European Society of Cardiology (Barcelone)**
  Méloux A, Rigal E, Rochette L, Cottin Y, Béjot Y, Vergely C. Experimental ischemic stroke in rats induce myocardial contractile dysfunction in vivo and ex vivo and increase cardiac vulnerability to ischemia-reperfusion injury ex vivo. *European Heart Journal,* 38 (1), P1742
- ✓ **2017 : Forum des Jeunes Chercheurs (Dijon)**
  Méloux A, Rigal E, Brenière C, Cottin Y, Rochette L, Béjot Y, Vergely C. Myocardial contractile function and vulnerability to ischemia ex vivo can be worsened by prior experimental ischemic stroke in rats.
- ✓ **2017 : Congrès du Printemps de la Cardiologie (Nantes)**
  Méloux A, Rigal E, Brenière C, Cottin Y, Rochette L, Béjot Y, Vergely C. Myocardial contractile function and vulnerability to ischemia ex vivo can be

worsened by prior experimental ischemic stroke in rats. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 9 (2), 158 (p226)

- ✓ **2016 : Federation of European physiological societies (Paris)**

  Rigal E, Méloux A, Merle L, Cellier L, Rochette L, Béjot Y, Vergely C. Experimental cerebral ischemia in rats increases myocardial vulnerability to ischemia reperfusion injury ex vivo.

- ✓ **2015 : Congrès Hopipharm (Reims)**

  Méloux A, Escapoulade L, Riou S, Palot JP, Renard Y, Hettler D, Frances C. Etat des lieux sur l'utilisation des prothèses biologiques Strattice® depuis leur référencement sur le CHU dans le traitement des cas complexes d'éventrations. P76

- ✓ **2015 : Congrès Hopipharm (Reims)**

  Escapoulade L, Riou S, Méloux A, Lafaurie M, Hettler D. Traçabilité informatisée des dispositifs médicaux implantables : vers un meilleur suivi des recommandations de bon usage ? P84

II. Publications

Ischemic Stroke Increases Heart Vulnerability to Ischemia-Reperfusion and Alters Myocardial Cardioprotective Pathways

Alexandre Meloux, MSc; Eve Rigal, MSc; Luc Rochette, PhD, PharmD; Yves Cottin, MD, PhD; Yannick Bejot, MD, PhD; Catherine Vergely, PhD, PharmD

Background and Purpose—For years, the relationship between cardiac and neurological ischemic events has been limited to overlapping pathophysiological mechanisms and common risk factors. However, acute stroke may induce dramatic changes in cardiovascular function. The aim of this study was to evaluate how prior cerebrovascular lesions affect myocardial function and signaling in vivo and ex vivo and how they influence cardiac vulnerability to ischemia-reperfusion injury.

Methods—Cerebral embolization was performed in adult Wistar male rats through the injection of microspheres into the left or right internal carotid artery. Stroke lesions were evaluated by microsphere counting, tissue staining, and assessment of neurological deficit 2 hours, 24 hours, and 7 days after surgery. Cardiac function was evaluated in vivo by echocardiography and ex vivo in isolated perfused hearts. Heart vulnerability to ischemia-reperfusion injury was investigated ex vivo at different times post-embolization and with varying degrees of myocardial ischemia. Left ventricles (LVs) were analyzed with Western blotting and quantitative real-time polymerase chain reaction.

Results—Our stroke model produced large cerebral infarcts with severe neurological deficit. Cardiac contractile dysfunction was observed with an early but persistent reduction of LV fractional shortening in vivo and of LV developed pressure ex vivo. Moreover, after 20 or 30 minutes of global cardiac ischemia, recovery of contractile function was poorer with impaired LV developed pressure and relaxation during reperfusion in both stroke groups. Following stroke, circulating levels of catecholamines and GDF15 (growth differentiation factor 15) increased. Cerebral embolization altered nitro-oxidative stress signaling and impaired the myocardial expression of ADRB1 (adrenoceptor β1) and cardioprotective Survivor Activating Factor Enhancement signaling pathways.

Conclusions—Our findings indicate that stroke not only impairs cardiac contractility but also worsens myocardial vulnerability to ischemia. The underlying molecular mechanisms of stroke-induced myocardial alterations after cerebral embolization remain to be established, insofar as they may involve the sympathetic nervous system and nitro-oxidative stress.

Visual Overview—An online visual overview is available for this article. **(*Stroke*. 2018;49:2752-2760. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.022207.)**

Key Words: brain ■ heart ■ stroke ■ myocardial ischemia ■ autonomic nervous system

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 25, 2018

Cardiovascular and cerebrovascular diseases share several pathophysiological mechanisms and risk factors, and they remain among the leading causes of death and medical spending worldwide. While it is well documented that cardiac diseases such as atrial fibrillation[1,2] or acute myocardial infarction[3] (AMI) may favor the occurrence of ischemic stroke (IS), some clinical data also suggest that acute cerebral ischemic events may in turn induce dramatic shifts in cardiovascular function.[4] For instance, Takotsubo cardiomyopathy may occur in the days after an IS.[5] Furthermore, it has been shown that ischemic lesions in specific brain regions such as the insular cortex are associated with cardiac dysfunction and sudden cardiac death.[6] Indeed, even in the absence of documented preliminary heart disease, myocardial dysfunction is commonly encountered in stroke patients.[7-10] Cardiovascular complications after stroke are the second cause of death after the direct consequences of neurological damage.[11,12] Moreover, a significant proportion of patients with IS display elevated levels of cardiac troponins,[7,13,14] relevant markers of myocardial damage, though half of them show no angiographic evidence of coronary artery disease.[15] Therefore, the possibility of stroke-induced myocardial dysfunction/injury needs to be investigated more thoroughly.

In experimental studies, a link has been established between brain damage and cardiac disorders. For instance, several studies have shown that middle cerebral artery occlusion

Received July 10, 2018; final revision received August 27, 2018; accepted September 10, 2018.
From the Equipe d'Accueil (EA 7460), Physiopathologie et Epidémiologie Cérébro-Cardiovasculaires (PEC2), Université de Bourgogne-Franche-Comté, UFR des Sciences de Santé, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France (A.M., E.R., L.R., Y.C., Y.B., C.V.); and Department of Cardiology (A.M., Y.C.) and Department of Neurology (Y.B.), University Hospital of Dijon, France.
The online-only Data Supplement is available with this article at https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/STROKEAHA.118.022207.
Correspondence to Catherine Vergely, PhD, PharmD, Université de Bourgogne, Facultés des Sciences de Santé, PEC2 (EA7460), Faculties of Health Sciences, 7 Bd Jeanne d'Arc, Dijon 21000, France. Email catherine.vergely@u-bourgogne.fr
© 2018 American Heart Association, Inc.

(MCAO) could impair calcium and other ionic currents in ventricular cardiomyocytes, thus inducing arrhythmia in rats,[16,17] and may also lead to cardiac contractile dysfunction in mice.[18] Another study further suggests that ischemic brain tissues send death signals to the heart.[19] Recently, it has been proposed that circulating components might directly be involved in cerebral ischemia-induced cardiac dysfunction such as MiR-126[20] or catecholamines.[21] However, to date, no work has extensively explored the potential vulnerability to myocardial ischemia/infarction associated with prior IS.

Therefore, it seems essential to evaluate how prior cerebral ischemia could alter cardiac function and its subsequent adaptation to ischemic stress, and which cardiac cellular signaling pathways involved in cardioprotection are impaired. The aim of this study was thus to mimic a situation of embolic stroke and to evaluate how cerebrovascular lesions may affect the heart functions at the in vivo, ex vivo, and cellular level.

Methods

This article adheres to the American Heart Association Journals implementation of the Transparency and Openness Promotion Guidelines. Details of materials and methods are available in the online-only Data Supplement. Data that support the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Animals

Wistar male rats (Charles River, Ecully, France; 8–9 weeks, 300±50 g) were used. All animals received humane care and study protocols complied with institutional guidelines. The investigation was performed in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No 85-23, revised 1996) and was approved by the local ethics committee (Comité d'Ethique de l'Expérimentation Animale Université-Bourgogne-Franche-Comté, Dijon, France, protocol agreement number: 0412.01). The animals were housed at 21±2°C with a constant humidity of 55±10% under a cycle of 12 hour of light/dark and had free access to water and standard diet ad libitum.

Model of Cerebral Embolization

Polystyrene microspheres (90 µm; Polysciences, Inc, Warrington) were used for cerebral embolization. The solution was diluted so as to inject around 4000 microspheres in 200 µL of 20% polyvinylpyrrolidone in the internal carotid artery. A detailed description of surgical procedure is available in the online-only Data Supplement.

Neurological Deficit Assessment and Determination of Cerebral Embolization and Infarct Size

Neurological deficit was assessed 2 hours, 24 hours, or 7 days after surgery using a modified scoring system developed by Longa et al[22] by an observer blinded to the animal groups. Deficits were scored as follows: 0, no deficits; 1, failure to extend contralateral forepaw fully; 2, circling to contralateral side without falling; 3, falling to contralateral side; and 4, no spontaneous motor activity. Higher scores represent more severe motion impairment. A detailed description of cerebral embolization determination and infarct size measurement are available in the online-only Data Supplement.

Assessment of Cardiac Function In Vivo With Echocardiography

Transthoracic echocardiography using the Vevo770 imaging system (VisualSonics Inc, Toronto, Canada) equipped with a 25 MHz probe was performed 7 days before surgery, 2 hours, 24 hours, and 7 days after surgery in rats as previously described,[23] and detailed in the online-only Data Supplement.

Assessment of Cardiac Function Ex Vivo

Two or 24 hours after cerebral embolization, rats were deeply anesthetized through an intraperitoneal injection of 110 mg/kg sodium pentobarbital, and the blood clotting was avoided by the co-administration of 500 IU/kg of heparin. After total loss of nociception, the chest was opened and the heart was excised and placed in a cold (4°C) perfusion buffer bath until contractions ceased. The heart was then immediately cannulated through the aorta and perfused according to the Langendorff method as previously described[24] and detailed in the online-only Data Supplement.

Measurement of Myocardial Vulnerability to Ischemia-Reperfusion Injury Ex Vivo

After baseline measurements, perfusion was turned off so as to induce 20 or 30 minutes of total global normothermic ischemia, which was followed by 1 hour of reperfusion. All parameters were recorded during ischemia and reperfusion.

Determination of Plasma Epinephrine, Norepinephrine, and Growth Differentiation Factor 15

Blood was collected from the abdominal aorta, and immediately centrifuged at 4°C to separate the plasma, and samples were stored at –80°C. Plasma epinephrine and norepinephrine levels were measured using the 2-CAT (A-N) Research ELISA kit (BA E-5400; Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany) following the manufacturer's protocol. Plasma GDF15 (growth differentiation factor 15) was measured using a commercially available kit (MGD150, R&D systems, MN).

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Semiquantitative analysis of eNOS (endothelial nitric oxide synthase), GPX1 (glutathione peroxidase 1), CAT (catalase), ADRB1 (adrenoceptor β1), JAK2 (janus kinase 2), and STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) were performed, and the procedure is detailed in the online-only Data Supplement.

Western Blotting

Ventricular tissue was homogenized in 10 volumes radio-immunoprecipitation assay buffer, centrifuged at 10000 g for 15 minutes at 4°C, and protein concentration (Lowry method) was determined in supernatant. Protein expressions were evaluated by Western blotting, and detailed procedures are available in the online-only Data Supplement.

Statistics

Data are presented as mean±SEM. The statistically significant differences for mean values of 3 groups were tested by analysis of variance followed by Tukey's test. An analysis of variance for repeated measurements followed by a Tukey post hoc analysis was applied for data consisting of repeated observations at successive time points. The difference was considered significant when $P<0.05$. The data were analyzed using SigmaPlot version 12.5.

Results

Cerebral Embolization With Microspheres Leads to Large Stroke Infarcts and Neurological Deficit

Severe neurological deficit scores were observed in all stroke groups 2 hours, 24 hours, and 7 days after embolization (Figure I in the online-only Data Supplement). Two hours after embolization, 397±33 microspheres were found in the ipsilateral

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 25, 2018

hemisphere and 54±5 in the contralateral hemisphere. 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride staining was performed in brain slices 24 hours after embolization. Sham-operated rats showed uniform red coloration of viable gray matter cell-containing areas and white staining of acellular white matter fibers (corpus callosum, internal capsule). In embolized rats, white necrotic areas were only observed in the ipsilateral hemisphere. Stroke volumes were 31±4% for the left ventricle (LV) and 29±4% for the right ventricle 24 hours after embolization.

Cerebral Embolization Leads to Cardiac Dysfunction Ex Vivo and In Vivo

Cardiovascular function was initially assessed in vivo. There were no statistically significant differences between the 3 groups concerning arterial systolic blood pressure (Figure 1A). We found an early (from H2) and persistent (until D7) deterioration in LV fractional shortening during the 7-day follow-up period in both stroke versus sham groups (Figure 1B).

Then, to evaluate poststroke cardiac function independently of any circulating and/or nervous influencing factors, we isolated and perfused the rat hearts ex vivo and measured left ventricular functional parameters. Two hours after cerebral embolization, the baseline LV developed pressure was significantly lower in both groups of stroke rats than in the sham group: 106.6±4.4 mm Hg (left), 106.2±4.7 mm Hg (right) versus 129.9±2.7 mm Hg (sham; Figure 1C). This difference was also observed 24 hours after surgery: 91.8±3.7 mm Hg (left), 104.0±5.3 mm Hg (right) versus 120.9±5.1 mm Hg (sham; Figure 1D). The other functional parameters were similar for the 3 groups during basal perfusion.

Cerebral Embolization Increases Cardiac Vulnerability to Ischemia-Reperfusion Injury Ex Vivo

To evaluate how prior IS may influence myocardial vulnerability to ischemia-reperfusion (IR) injury, we exposed hearts isolated 2 hours after cerebral embolization to 30 minutes of global total ischemia, which is generally considered as partially irreversible. Reperfusion led to only limited recovery of the initial cardiac functional parameters. In the right stroke group, the post-ischemic recovery of coronary flow was significantly lower than that in the sham group: 8.3±0.1 mL/min versus 10.6±0.2 mL/min, respectively, $P<0.05$ (Figure 2A). During ischemia, the heart stopped beating, but an increase in LV diastolic pressure because of ischemic contracture was observed in both groups. Reperfusion led to an abrupt and sharp increase in LV diastolic pressure, related to post-ischemic contracture that was even higher in the right stroke group than that in the sham group from the 20th minute of reperfusion: 90.6±4.2 mm Hg versus 72.6±4.3 mm Hg, respectively, $P<0.05$ (Figure 2B). After 30 min of global total ischemia, reperfusion led to only a partial recovery of myocardial contractility in all groups, with identical return to an altered sinus rhythm (data not shown). However, the LV developed

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 25, 2018

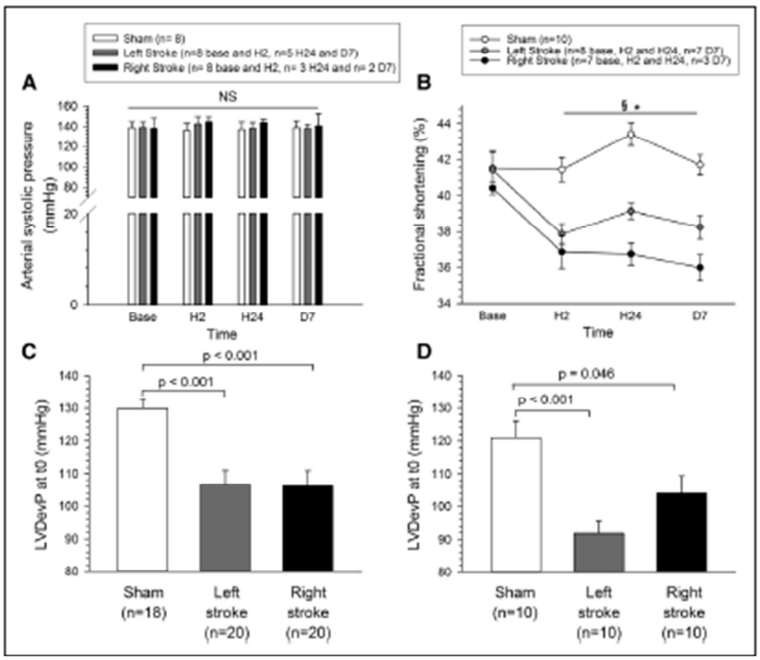


Figure 1. Cardiovascular function in vivo and ex vivo. **A**, Arterial systolic blood pressure after right of left cerebral embolization. **B**, Natural course of left ventricle (LV) fractional shortening. *$P<0.05$ significantly different between left stroke and sham groups and §$P<0.05$ significantly different between right stroke and sham groups. **C**, LV developed pressure (LVDevP) of isolated perfused rat hearts 2 hours after right or left cerebral embolization during the initial minute of baseline perfusion (t0). **D**, LVDevP of isolated perfused rat hearts 24 hours after right or left cerebral embolization during the initial minute of baseline perfusion (t0).

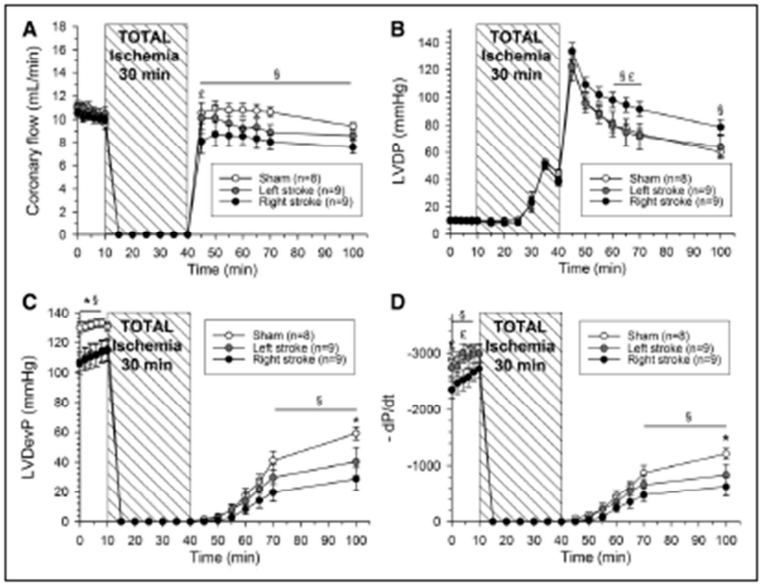


Figure 2. Evolution of functional parameters of isolated perfused hearts, 2 hours after embolization or sham-surgery. **A**, Coronary flow; (**B**), LVDP; (**C**), LV developed pressure (LVDevP); (**D**), –d*P*/d*t*. Hearts were perfused for 10 min at baseline and then underwent 30 min of global total normothermic ischemia followed by 1 h of reperfusion. **P*<0.05 significantly different between left stroke and sham groups, §*P*<0.05 significantly different between right stroke and sham groups and £*P*<0.05 significantly different between left stroke and right stroke groups at the same measurement time using 2-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures.

pressure and –d*P*/d*t* were significantly lower in both right and left stroke groups than in the sham group after 60 minutes of reperfusion (Figure 2C and 2D).

In a second set of experiments, we evaluated the myocardial vulnerability to a more reversible IR injury and subjected isolated hearts to 20 minutes of global total ischemia followed

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 25, 2018

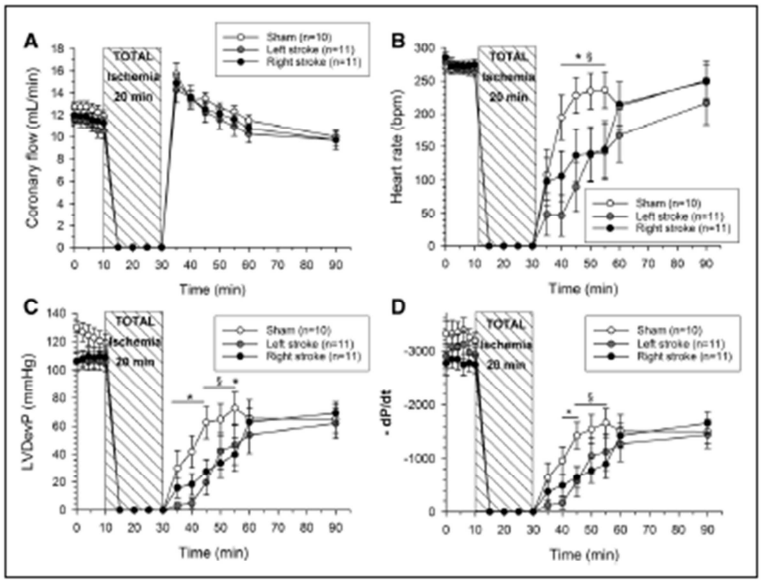


Figure 3. Evolution of functional parameters of isolated perfused hearts, 2 h after embolization or sham-surgery. **A**, Coronary flow; (**B**), HR; (**C**), LV developed pressure (LVDevP); (**D**), –d*P*/d*t*. Hearts were perfused for 10 min at baseline and then underwent 20 min of global total normothermic ischemia followed by 1 h of reperfusion. **P*<0.05 significantly different between left stroke and sham groups and §*P*<0.05 significantly different between right stroke and sham groups at the same measurement time using 2-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures.

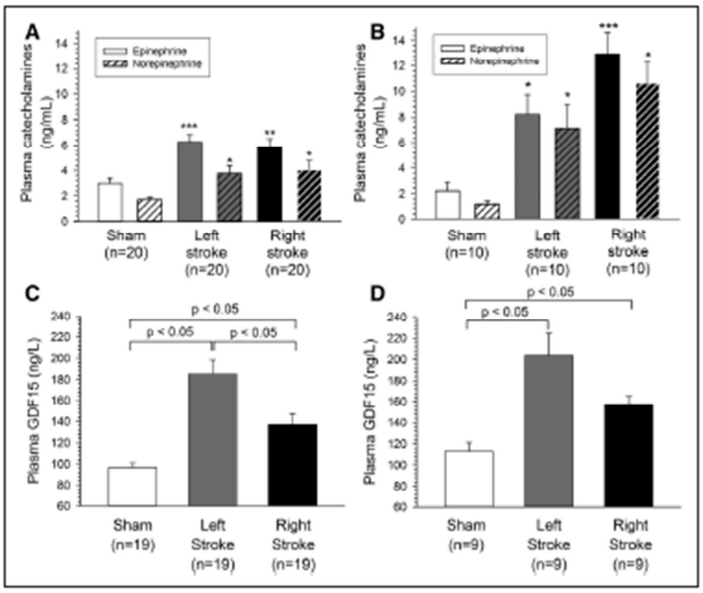


Figure 4. Catecholamines and GDF15 (growth differentiation factor 15) plasma concentrations. **A**, Catecholamines levels 2 h after embolization. **B**, Catecholamines levels 24 h after embolization. *P<0.05 vs sham groups, **P<0.01 vs sham groups and ***P<0.001 vs sham groups. **C**, GDF15 Levels 2 h after embolization. **D**, GDF15 Levels 24 h after embolization.

by reperfusion. In these conditions, all 3 groups recovered total coronary flow with hyperemia during the 20 first minutes of reperfusion (Figure 3A). However, concerning cardiac contractility, HR, LV developed pressure, and $-dP/dt$ recovered significantly more slowly during reperfusion in both stroke groups than in the sham group (Figure 3B, 3C, and 3D).

Myocardial recovery after IR injury was also evaluated 24 hours after stroke or sham embolization (Figure II in the online-only Data Supplement). However, unattended nearly total recovery of all functional parameters was observed in sham groups, as compared to the same duration of cardiac ischemia in hearts harvested 2 hours after microsphere embolization or sham-surgery under isoflurane anesthesia. In these very different conditions, post-ischemic recovery of myocardial functional parameters did not differ between groups, except for HR or LV developed pressure in left stroke hearts at certain points in time.

Cardiac Dysfunction After Cerebral Embolization Is Associated With Increased Catecholamine and GDF15 Levels in Circulation

To evaluate the activation of the autonomic nervous system, we assessed plasma concentration of catecholamines. At 2 and 24 hours after embolization, both stroke groups showed a significant increase in plasma epinephrine and norepinephrine as compared to sham-operated rats (Figure 4A and 4B).

GDF15, a marker of several conditions including cardiovascular disease, was circulating at higher levels 2 hours after cerebral embolization in both groups of stroke rats than in the sham group (Figure 4C): 185.3±13.3 ng/L (left), 137.0±10.4 ng/L (right) versus 96.7±4.3 ng/L (sham). This difference was also observed 24 hours after surgery: 203.9±20.5 ng/L (left), 157.4±7.6 ng/L (right) versus 113.0±8.3 ng/L (sham; Figure 4D).

Cerebral Embolization Alters Nitro-Oxidative Signaling in the Heart

To examine the potential impact of stroke on myocardial cellular signaling, genes and proteins involved in nitro-oxidative stress were assed in the myocardium. Left or right cerebral embolization significantly increased the cardiac expression of eNOS and GPX1 in mRNA and protein and decreased protein expression of phosphorylated eNOS. CAT protein expression was decreased in the hearts of left or right stroke rats without modifications of the mRNA levels (Figure 5; Figure III in the online-only Data Supplement).

Cerebral Embolization Impaired Myocardial Expression of ADRB1 and Cardioprotective Survivor Activating Factor Enhancement Signaling Pathway

The expression of the main cardiac adrenergic receptor, ADRB1, was investigated to evaluate the potential mechanism of stroke-induced myocardial contractile dysfunction, despite increased circulating epinephrine and norepinephrine levels. The results showed decreased protein expression of ADRB1 (Figure 6A).

So as to understand how prior cerebral infarction was able to worsen myocardial functional recovery after either reversible or irreversible cardiac ischemic injury, members of the Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) cardioprotective signaling pathway were assessed in the myocardium. The results showed that left or right cerebral embolization significantly decreased short-term cardiac expression of JAK2, STAT3, and phosphorylated STAT3 in protein (Figure 6).

Discussion

In the present study, we show for the first time that prior cerebral ischemia in rats can increase myocardial vulnerability

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 25, 2018

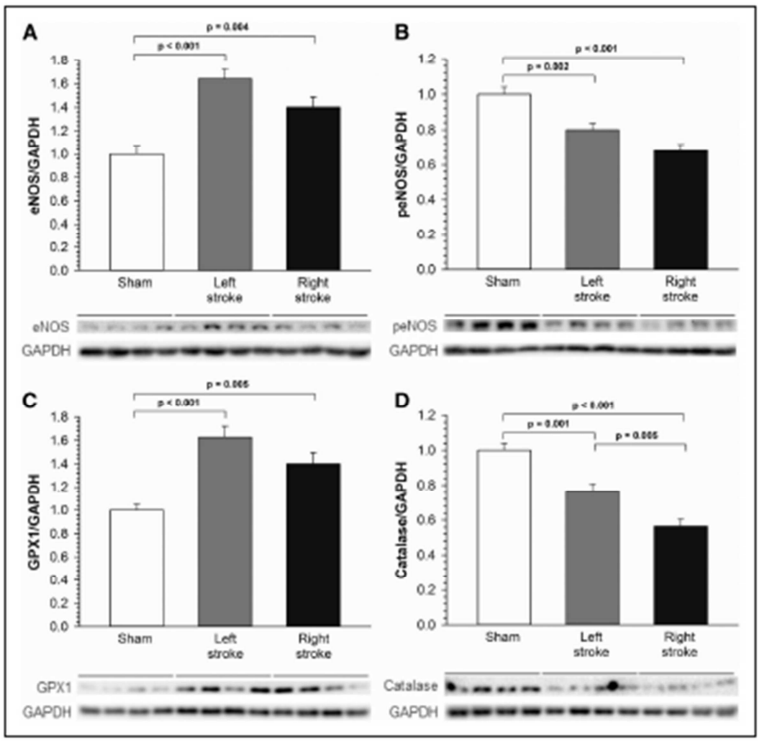


Figure 5. Heart eNOS (endothelial nitric oxide synthase; **A**), phosphorylated eNOS (**B**), GPX1 (glutathione peroxidase 1; **C**), and CAT (catalase; **D**) protein levels determined by Western blot analysis 2 h after embolization. Data were normalized to GAPDH. n=12 per group.

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 25, 2018

to IR injury and alter cellular signaling in the genes and proteins generally considered as providing cardioprotection, such as endothelial nitric oxide synthase and members of the SAFE pathway. We have also highlighted a change in cardiac contractile function both in vivo and ex vivo, the latter being observed in a situation where neither circulating factors nor nervous control could influence cardiac function, suggesting that stroke has a persisting imprinting effect on heart tissue. Sympathetic hyperactivity with a rise of circulating catecholamines, as opposed to a downregulation of cardiac ADRB1 protein, could be considered as one of the potential mechanisms of stroke-driven cardiovascular deleterious effects.

The model of cerebral embolization with microsphere injection into the internal carotid artery was chosen because it may reproduce some aspects of embolic strokes of cardiac or carotid origin.[25] One limitation of this model is that microspheres are randomly distributed throughout the brain and produce disseminated infarcts, as opposed to conventional MCAO for which stroke volume and location in specific areas of the brain can be evaluated. In fact, it could be interesting to induce damage in defined brain regions such as the insular cortex, the activation of which leads to cardiovascular consequences.[6] Finally, the microsphere embolization model induces nonreversible artery occlusion and produces the creation of small permanent cerebral infarcts,[26] while in stroke patients reperfusion can occur spontaneously or be clinically induced by thrombolysis. However, the majority of patients with large vessel stroke do not have recanalization[27]; our model may therefore be appropriate for preclinical evaluation of large vessel occlusion.

Brain-heart interactions after stroke have been observed in several clinical and animal studies, and recent data further suggest that aging, hypertension, and diabetes mellitus contribute to distinctly affect microvessels gene network in these 2 organs.[28] Indeed, atrial fibrillation may occur after an IS[29]: in the 3 months after an IS, 19% of patients experience serious cardiac adverse events[12] and 6.5% of patients develop AMI or acute heart failure.[30] From an experimental point of view, in vivo studies have shown that cerebral injuries can induce severe cardiac arrhythmia, myocardial dysfunction, and even cardiomyocyte necrosis.[18,31] Experiments performed ex vivo have shown that cardiomyocytes isolated from the hearts of right MCAO rats displayed longer action potential duration.[17,31] In our study, IS involved the insular cortex which may have had an impact on cardiac function in vivo (see Figure 2). One of the striking observations of our work is that prior IS was not only able to decrease LV contractility in vivo, but also ex vivo in isolated perfused hearts, where neither circulating nor nervous factors influence cardiovascular function. This observation is remarkable because it suggests that cerebral ischemia has a persistent impact on the heart through signals

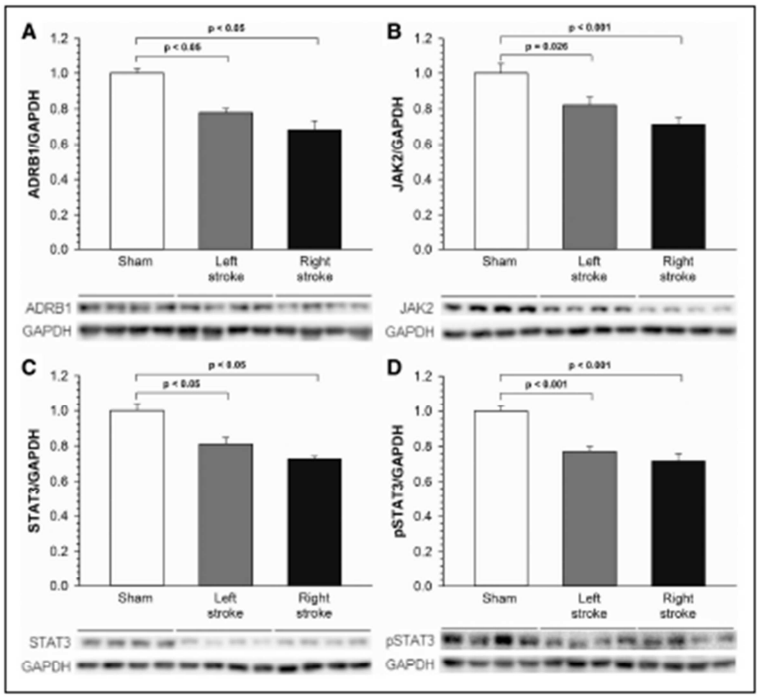


Figure 6. Heart ADRB1 (adrenoceptor β1; **A**), JAK2 (janus kinase 2; **B**), STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3; **C**), and phosphorylated STAT3 (**D**) protein levels determined by Western blot analysis 2 h after embolization. Data were normalized to GAPDH. n=12 per group.

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 25, 2018

that affect its function in addition to direct endocrine and/or neuronal effect and that this retained effect occurs as early as 2 hours after embolization. Our findings therefore corroborate other studies showing that MCAO in rats was able to impact the calcium currents and channels of the cardiomyocyte, as well as other ionic currents and proteins involved in the action potential[17,31] or in the cardiac excitation-contraction coupling.[16]

Another original result of the present study is that prior cerebral ischemia is able to increase myocardial vulnerability to IR injury ex vivo. Indeed, we found a negative impact of cerebral embolization on functional recovery of isolated hearts after either reversible or irreversible total global ischemia. The deleterious effect of stroke is clear 2 hours after surgery but is partially hidden after a longer lapse of time (24 hours), probably because of the delayed preconditioning effect of both isoflurane anesthesia and the surgical procedure. The observation that prior cerebral ischemia may worsen myocardial post-ischemic recovery can be regarded as paradoxical in view of the well-known concept of remote ischemic conditioning, by which ischemia to a distant organ may protect the heart against AMI. When extended to the clinical situation, these results may raise the question of whether stroke patients have increased vulnerability to AMI. Our results may therefore corroborate data showing that patients who developed an AMI after an IS had an increased mortality rate versus the general population.[30] We also observed that right hemispheric strokes were more damaging for cardiac function and post-ischemic recovery than left hemispheric strokes. In fact, it has been shown both in humans and in experimental studies that a lateralization exists concerning cardiac effects of cerebral ischemia, which is related to that distinct areas in the left or right brain insula control either the sympathetic or the parasympathetic autonomic nervous system.[32] Indeed, several studies have shown that right stroke begets more cardiovascular effects such as arrhythmias or increased myocardial damage confirmed by elevated troponin levels.[21,31,33] It has been proposed that right-sided insular cortex regulates sympathetic tone, whereas left controls parasympathetic. Vascular damage in right hemisphere involves a downregulation of parasympathetic activity with an upregulation of the sympathetic consequence on cardiac function.[33] However, the microsphere embolization model used in the present study, as stated before, does not allow for a study of the impact of revascularization on stroke-induced cardiac effects. Future studies with a model allowing both reperfusion, damage in selective brain regions, and different stroke durations such as the MCAO model are planned, so as to determine whether the myocardial ischemic vulnerability after an IS persists when the brain is reperfused and if the cardiac impact of cerebral ischemia is still present at a later time after stroke.

Following these observations, we aimed to determine which cardiac cellular pathways could be modified by prior stroke and thus could be involved in these stroke-induced alterations of myocardial function. It is well known that stroke

is associated with an activation of the sympathetic nervous system, which is consistent with our data showing increased catecholamine levels in stroke groups.[18,21] It has been shown that β1-blocker treatment in stroke mice improved cardiac function and decreased catecholamine levels 2 months after IS and had neuroprotective effects over the 7-day follow-up period.[21,34] In the present study, a downregulation of ADRB1 was observed in hearts 2 hours after embolization, which could be a result of post-translational regulating systems. GDF15 levels were also increased in stroke rats 2 and 24 hours after embolization as compared to sham groups. It has been shown that GDF15 levels were significantly increased in patients with IS and even more when stroke involved large arteries. Indeed, GDF15 gene polymorphism may play a role in the development of IS.[35] Concomitantly to IS, several neurohumoral systems, including inflammatory cytokines, are activated, and recent data have shown that chronic inflammation may propagate from the ischemic cerebellum to distant peripheral organs such as the heart.[36] The occurrence of a nitro-oxidative stress could also be involved in these brain-heart interactions, which has been shown after transient MCAO in rats.[37] The increased gene and protein expression of GPX1 should be opposed to decrease in CAT which has an 8-fold higher activity than GPX1 in humans.[38] Additionally, it has been shown that some cardioprotective molecular pathways could be recruited by the cardiac tissue to fight the damaging effects of ischemia reperfusion injury.[39] Taking into consideration the idea that prior stroke impaired post-ischemic cardiac recovery, we hypothesized that some members of the cardioprotective pathways might have been altered after cerebral ischemia. In fact, JAK2, STAT3, and phosphorylated STAT3 protein expression, all members of the SAFE cardioprotective signaling pathway, decreased in the heart 2 hours after cerebral embolization. Therefore, the increased vulnerability of the heart to ischemia reperfusion injury after stroke might be, at least in part, related to an impairment of the SAFE signaling pathway. An upregulation or a pharmacological induction of these signaling pathways could therefore be used as therapeutic target to protect the heart after IS.

Conclusions

These original data indicate not only that, in a model of cerebral embolization in rats, stroke deleteriously impairs cardiac contractility but also worsens myocardial vulnerability to ischemia. At the molecular level, we highlighted sympathetic hyperactivity, a disturbance of nitro-oxidative regulators in the heart, and impairment of the cardioprotective SAFE signaling pathway. The underlying molecular mechanisms of the stroke-induced myocardial alterations after cerebral embolization remain to be established, insofar as they may involve the sympathetic nervous system or and nitro-oxidative stress. From a clinical point of view, these results may be of major importance for the management of stroke patients, to protect the heart after cerebral ischemia.

Acknowledgments

We thank Suzanne Rankin for English revision of the article and Ivan Porcherot and Angeline Jobez for technical assistance.

Sources of Funding

This study has been supported by funding from the French Ministry of Research, from the Regional Council of Burgundy, from the Association Bourguignonne de Cardiologie, and from the Regional University Hospital and Faculty of Heath Sciences.

Disclosures

Yannick Béjot received honoraria for lectures or consulting fees from AstraZeneca, Daiichi-Sankyo, BMS, Pfizer, Medtronic, MSD France, Amgen, and Boehringer-Ingelheim. The other authors report no conflicts.

References

1. Staerk L, Sherer JA, Ko D, Benjamin EJ, Helm RH. Atrial fibrillation: epidemiology, pathophysiology, and clinical outcomes. *Circ Res*. 2017;120:1501–1517. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309732
2. Fernandez V, Béjot Y, Zeller M, Hamblin J, Daubail B, Jacquin A, et al. Silent atrial fibrillation after ischemic stroke or transient ischemic attack: interest of continuous ECG monitoring. *Eur Neurol*. 2014;71:313–318. doi: 10.1159/000357561
3. Hachet O, Guenancia C, Stamboul K, Daubail B, Richard C, Béjot Y, et al. Frequency and predictors of stroke after acute myocardial infarction: specific aspects of in-hospital and postdischarge events. *Stroke*. 2014;45:3514–3520. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006707
4. Gunnoo T, Hasan N, Khan MS, Slark J, Bentley P, Sharma P. Quantifying the risk of heart disease following acute ischaemic stroke: a meta-analysis of over 50,000 participants. *BMJ Open*. 2016;6:e009535. doi: 10.1136/bmjopen-2015-009535
5. Ranieri M, Finsterer J, Bedini G, Parati EA, Bersano A. Takotsubo syndrome: clinical features, pathogenesis, treatment, and relationship with cerebrovascular diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018;18:20. doi: 10.1007/s11910-018-0833-7
6. Oppenheimer S, Cechetto D. The insular cortex and the regulation of cardiac function. *Compr Physiol*. 2016;6:1081–1133. doi: 10.1002/cphy.c140076
7. Ay H, Koroshetz WJ, Benner T, Vangel MG, Melinosky C, Arsava EM, et al. Neuroanatomic correlates of stroke-related myocardial injury. *Neurology*. 2006;66:1325–1329. doi: 10.1212/01.wnl.0000206077.13705.6d
8. Oppenheimer SM. Neurogenic cardiac effects of cerebrovascular disease. *Curr Opin Neurol*. 1994;7:20–24.
9. Colivicchi F, Bassi A, Santini M, Caltagirone C. Cardiac autonomic derangement and arrhythmias in right-sided stroke with insular involvement. *Stroke*. 2004;35:2094–2098. doi: 10.1161/01.STR.0000138452.81003.4c
10. Laowattana S, Zeger SL, Lima JA, Goodman SN, Witstein IS, Oppenheimer SM. Left insular stroke is associated with adverse cardiac outcome. *Neurology*. 2006;66:477–483; discussion 463. doi: 10.1212/01.wnl.0000202684.29640.60
11. Touzé E, Varenne O, Chatellier G, Peyrard S, Rothwell PM, Mas JL. Risk of myocardial infarction and vascular death after transient ischemic attack and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Stroke*. 2005;36:2748–2755. doi: 10.1161/01.STR.0000190118.02275.33
12. Prosser J, MacGregor L, Lees KR, Diener HC, Hacke W, Davis S; VISTA Investigators. Predictors of early cardiac morbidity and mortality after ischemic stroke. *Stroke*. 2007;38:2295–2302. doi: 10.1161/STROKEAHA.106.471813
13. Barber M, Morton JJ, Macfarlane PW, Barlow N, Roditi G, Stott DJ. Elevated troponin levels are associated with sympathoadrenal activation in acute ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2007;23:260–266. doi: 10.1159/000098325
14. Ahn SH, Kim YH, Shin CH, Lee JS, Kim BJ, Kim YJ, et al. Cardiac vulnerability to cerebrogenic stress as a possible cause of troponin elevation in stroke. *J Am Heart Assoc*. 2016;5:e004135. doi: 10.1161/JAHA.116.004135
15. Mochmann HC, Scheitz JF, Petzold GC, Haeusler KG, Audebert HJ, Laufs U, et al; TRELAS Study Group. Coronary angiographic findings in acute ischemic stroke patients with elevated cardiac troponin: the Troponin Elevation in Acute Ischemic Stroke (TRELAS) Study. *Circulation*. 2016;133:1264–1271. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018547
16. Sun L, Ai J, Wang N, Zhang R, Li J, Zhang T, et al. Cerebral ischemia elicits aberration in myocardium contractile function and intracellular calcium handling. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26:421–430. doi: 10.1159/000320584

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 25, 2018

17. Wang L, Sun L, Zhang Y, Wu H, Li C, Pan Z, et al. Ionic mechanisms underlying action potential prolongation by focal cerebral ischemia in rat ventricular myocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2009;23:305–316. doi: 10.1159/000218177
18. Min J, Farooq MU, Greenberg E, Aloka F, Bhatt A, Kassab M, et al. Cardiac dysfunction after left permanent cerebral focal ischemia: the brain and heart connection. *Stroke*. 2009;40:2560–2563. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.536086
19. Ishikawa H, Tajiri N, Vasconcellos J, Kaneko Y, Mimura O, Dezawa M, et al. Ischemic stroke brain sends indirect cell death signals to the heart. *Stroke*. 2013;44:3175–3182. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001714
20. Chen J, Cui C, Yang X, Xu J, Venkat P, Zacharek A, et al. MiR-126 affects brain-heart interaction after cerebral ischemic stroke. *Transl Stroke Res*. 2017;8:374–385. doi: 10.1007/s12975-017-0520-z
21. Bieber M, Werner RA, Tanai E, Hofmann U, Higuchi T, Schuh K, et al. Stroke-induced chronic systolic dysfunction driven by sympathetic overactivity. *Ann Neurol*. 2017;82:729–743. doi: 10.1002/ana.25073
22. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84–91.
23. Richard C, Lauzier B, Delemasure S, Talbot S, Ghibu S, Collin B, et al. Effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;52:278–285. doi: 10.1097/FJC.0b013c3181865f28
24. Li N, Guenancia C, Rigal E, Hachet O, Chollet P, Desmoulins L, et al. Short-term moderate diet restriction in adulthood can reverse oxidative, cardiovascular and metabolic alterations induced by postnatal overfeeding in mice. *Sci Rep*. 2016;6:30817. doi: 10.1038/srep30817
25. Hossmann KA. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res*. 1998;39:106–120.
26. Bere Z, Obrenovitch TP, Kozák G, Bari F, Farkas E. Imaging reveals the focal area of spreading depolarizations and a variety of hemodynamic responses in a rat microembolic stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34:1695–1705. doi: 10.1038/jcbfm.2014.136
27. McBride DW, Zhang JH. Precision stroke animal models: the permanent mcao model should be the primary model, not transient mcao [published online July 17, 2017]. *Transl Stroke Res*. doi: 10.1007/s12975-017-0554-2. https://link-springer-com.gate2.inist.fr/article/10.1007%2Fs12975-017-0554-2.
28. Guo S, Deng W, Xing C, Zhou Y, Ning M, Lo EH. Effects of aging, hypertension and diabetes on the mouse brain and heart vasculomes [published online July 19, 2018]. *Neurobiol Dis*. doi: 10.1016/j.nbd.2018.07.021. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996118302912?via%3Dihub.
29. Kishore A, Vail A, Majid A, Dawson J, Lees KR, Tyrrell PJ, et al. Detection of atrial fibrillation after ischemic stroke or transient ischemic attack: a systematic review and meta-analysis. *Stroke*. 2014;45:520–526. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.003433
30. Micheli S, Agnelli G, Caso V, Alberti A, Palmerini F, Venti M, et al. Acute myocardial infarction and heart failure in acute stroke patients: frequency and influence on clinical outcome. *J Neurol*. 2012;259:106–110. doi: 10.1007/s00415-011-6136-4
31. Sun L, Du J, Zhang G, Zhang Y, Pan G, Wang L, et al. Aberration of L-type calcium channel in cardiac myocytes is one of the mechanisms of arrhythmia induced by cerebral ischemia. *Cell Physiol Biochem*. 2008;22:147–156. doi: 10.1159/000149792
32. Cheung RT, Hachinski V. Cardiac effects of stroke. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2004;6:199–207.
33. Krause T, Werner K, Fiebach JB, Villringer K, Piper SK, Haeusler KG, et al. Stroke in right dorsal anterior insular cortex is related to myocardial injury. *Ann Neurol*. 2017;81:502–511. doi: 10.1002/ana.24906
34. Goyagi T, Horiguchi T, Nishikawa T, Tobe Y. Post-treatment with selective β1 adrenoceptor antagonists provides neuroprotection against transient focal ischemia in rats. *Brain Res*. 2010;1343:213–217. doi: 10.1016/j.brainres.2010.04.079
35. Xiang Y, Zhang T, Guo J, Peng YF, Wei YS. The association of growth differentiation factor-15 gene polymorphisms with growth differentiation factor-15 serum levels and risk of ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017;26:2111–2119. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.04.031
36. Acosta SA, Mashkouri S, Nwokoye D, Lee JY, Borlongan CV. Chronic inflammation and apoptosis propagate in ischemic cerebellum and heart of non-human primates. *Oncotarget*. 2017;8:102820–102834. doi: 10.18632/oncotarget.18330
37. Altintas O, Kumas M, Altintas MO. Neuroprotective effect of ischemic preconditioning via modulating the expression of adropin and oxidative markers against transient cerebral ischemia in diabetic rats. *Peptides*. 2016;79:31–38. doi: 10.1016/j.peptides.2016.03.011
38. Bastaki M, Huen K, Manzanillo P, Chande N, Chen C, Balmes JR, et al. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16:279–286. doi: 10.1097/01.fpc.0000199498.08725.9c
39. Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic Biol Med*. 2018;117:76–89. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 25, 2018

Pharmacology and Therapeutics 182 (2018) 115–132

Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology and Therapeutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmthera

The role of osteoprotegerin in the crosstalk between vessels and bone: Its potential utility as a marker of cardiometabolic diseases

Luc Rochette[a,*], Alexandre Meloux[a], Eve Rigal[a], Marianne Zeller[a], Yves Cottin[a,b], Catherine Vergely[a]

[a] Equipe d'Accueil (EA 7460): Physiopathologie et Epidémiologie Cérébro-Cardiovasculaires (PEC2), Université de Bourgogne – Franche Comté, Faculté des Sciences de Santé, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France
[b] Service de Cardiologie, CHU, Dijon, France

ABSTRACT

Among the numerous molecules that are being studied for their potential utility as biomarkers of cardiovascular diseases, much interest has been shown in the superfamily of tumor necrosis factor (TNF) receptors. Members of this family include osteoprotegerin (OPG) and its ligands, which are receptor activators of nuclear factor κB ligand (RANKL) and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). These signals may be expressed and regulated, and their functions could be involved in several physiological and pathological processes. The relationship between bone regulatory proteins and vascular biology has attracted attention, and it has been suggested that OPG may mediate vascular calcification and cardiometabolic diseases. OPG is steadily released from vascular endothelial cells in response to inflammatory stimuli, suggesting that it plays a modulatory role in vascular injury, inflammation, and atherosclerosis. Vascular calcification, a hallmark of atherosclerosis, is similar to bone remodeling. It is an actively regulated mechanism that includes both inductive and inhibitory processes. There is a temporal link between the development of osteoporosis and vascular calcification, which is particularly marked in post-menopausal women and the elderly. The precise nature of the link between bone metabolism, vascular calcification and cardiovascular disease is largely unknown but increasing evidence suggests that the triad of RANK/RANKL/OPG may be important in the initiation of various diseases. An increased release of OPG is associated with increased cardiovascular risk and it is suggested that increased OPG levels resulting from vascular damage correspond to a protective mechanism. Circulating OPG levels could be used as independent biomarkers of cardiovascular disease in patients with acute or chronic cardiometabolic disease and thus an improved prognosis.

Abbreviations: aa, amino acid; ADMA, asymmetric dimethylarginine; AF, atrial fibrillation; ALP, alkaline phosphatase; BMI, body mass index; BMP, bone morphogenetic protein; Cys, cysteine; CAD, coronary artery disease; CKD, chronic kidney disease; CRD, cysteine rich domain; CVD, cardiovascular disease; DDHs, death domain homologous regions; DR, death receptors; EC, endothelial cell; ECD, extracellular domain; ECFC, endothelial colony-forming cell; EPC, endothelial progenitor cell; EVs, extracellular vesicles; ER, estrogen receptor; FGF-23, fibroblast growth factor-23; GAG, glycosaminoglycan; GDF-15, growth differentiation factor-15; GLA, gamma-carboxyglutamic acid; GPR-48, G-protein-coupled receptor 48; hCRP, high sensitivity C-reactive protein; HIF, hypoxia-inducible factor; HOMA, homeostatic model assessment; HS, heparan sulfate; Hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; HSPGs, heparan sulfate proteoglycans; HUVEC, human umbilical cord vein endothelial cells; ICAM, intercellular adhesion molecule; IGF, insulin-like growth factor; IGFR, IGF receptor; IL-1, interleukin 1; IRF, interferon-regulatory factor; kDa, kilodalton; L-Arg, L-Arginine; LCN2, lipocalin-2; LDLR, low-density lipoprotein receptor; LGR, leucine-rich repeats containing G-protein-coupled receptors; LRP, lipoprotein-related receptor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCP, monocyte chemotactic protein-; miRNA, microRNA; MetS, metabolic syndrome; MMP, matrix metalloprotease; MSC, mesenchymal stem cell; MVP, mitral valve prolapse; NADP, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; NF-κB, nuclear factor κB; NO, nitric oxide; NOS, NO synthase; NOX, NADPH oxidase; Nrf2, nuclear factor-E2-related factor 2; NT-proBNP, N-terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide; OCIF, osteoclastogenesis inhibitory factor; OP, osteoporosis; OPG, osteoprotegerin; PAH, pulmonary arterial hypertension; PG, proteoglycan; PI3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; PTH, parathyroid hormone; PWV, pulse wave velocity; RA, rheumatoid arthritis; RANK, receptor activator of nuclear factor κ B; RANKL, receptor activator of nuclear factor κ B ligand; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; RSPO, roof-plate-specific spondin; RUNX2, runt-related transcription factor-2; SLE, systemic lupus erythematosus; ST2, suppression of tumorigenicity 2; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor; TNFR, tumor necrosis factor receptor; TNFRS, tumor necrosis factor receptor superfamily; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; TRAF, TNFR-associated factor; TSP-1, thrombospondin-1; VCAM, vascular adhesion molecule; VDR, vitamin D receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor; VSMC, vascular smooth muscle cells; vWF, von Willebrand factor; WPB, Weibel-Palade bodies

* Corresponding author.
E-mail address: luc.rochette@u-bourgogne.fr (L. Rochette).

http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.015

Available online 01 September 2017
0163-7258/ © 2017 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) remain a major cause of premature death and chronic disability for all regions of the world. Ischemic heart disease (IHD) and stroke account for the majority of health lost to CVD. Moreover, current predictions estimate that by the year 2020 cardiometabolic diseases, notably atherosclerosis and diabetes, will become the leading global cause of total disease burden. Diabetes mellitus affects 1 in 10 US adults, with 90% to 95% of cases being type 2 diabetes mellitus (Roth et al., 2015; Writing Group et al., 2016).

Primary and secondary preventive actions are required to limit or stop the development of CVD. The identification of markers able to detect the early stages of such diseases is essential so that action can be taken to attenuate the deteriorating clinical situation.

Among the numerous molecules being studied for their potential utility as CVD biomarkers, much attention is being paid to the superfamily of tumor necrosis factor (TNF) receptors. Members of this family include osteoprotegerin (OPG), and its ligands, which are receptor activators of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Classically, the OPG/RANK/RANKL network is involved in bone remodeling and regulates the differentiation and activation of osteoclasts and hence the critical balance between bone formation and bone resorption (Theoleyre et al., 2004; Walsh & Choi, 2014).

Recently, a relationship between bone regulatory proteins and vascular biology has attracted attention, and it has been suggested that OPG may mediate vascular calcification. Vascular calcification has a variety of forms, including intimal calcification and medial calcification, but can also be found in the valves of the heart. Vascular calcification is a hallmark of atherosclerosis and is associated with diabetes, cardiovascular diseases and kidney diseases, especially chronic kidney disease (CKD) (Cianciolo et al., 2014; Nicoll, Zhao, Ibrahimi, Olivecrona, & Henein, 2016).

Patients with vascular calcification are at higher risk for adverse cardiovascular events (Nakahara et al., 2017). Vascular calcification, like bone remodeling, is an actively regulated process that includes both inductive and inhibitory processes. The precise nature of the link between vascular calcification and cardiovascular disease is largely unknown but growing evidence suggests that the triad of RANK/RANKL/OPG may be important in vascular calcification (Harper et al., 2016).

The objective of this review article is 1) to provide an overview of the main physiological and pathophysiological aspects of OPG and 2) to encourage diagnostic value of serum OPG levels for clinical use and assess its potential utility as a marker of cardio-metabolism. In the first part of the following section, we summarize the main characteristics of bone mineralization and vascular calcification.

2. Overview of the regulation of bone mineralization

Bone is a dynamic organ, once formed it is continually broken down and reformed by the action of osteoblasts, which mediate bone formation, and osteoclasts, which mediate bone resorption. Coupling between bone formation and bone resorption (remodeling) refers to a process within multicellular units.

The blood vessels in bone are necessary for nearly all skeletal functions, including development, homeostasis, and repair. A dense vascular network delivers oxygen and nutrients (minerals such as calcium) to all 206 bones in the human body (Tomlinson & Silva, 2013). Osteoclasts are the main mineral-resorbing cells in the body (Tomlinson & Silva, 2013) and require coordinated co-stimulation by several signaling pathways to initiate and regulate their cellular differentiation. They are formed from fusing mononuclear precursor cells of the myeloid lineage and differentiate in response to cytokines, including macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) RANK and RANKL (Iwai et al., 2007). RANK is a type I membrane protein expressed on the surface of osteoclasts (Sims & Martin, 2014, 2015).

Most adult skeletal diseases such as osteoporosis (OP) result from the disruption of bone homeostasis. OP is characterized by decreased bone mineral density (BMD) and poor bone quality, with a deterioration in skeletal microarchitecture and a predisposition to fracture. The treatment of osteoporosis is based on two types of drugs to increase BMD: antiresorptive and anabolic agents. Antiresorptive drugs inhibit osteoclasts. OP and CVD were considered independently related to ageing. Nonetheless, increasing data in recent years suggest a close relationship between OP and atherosclerosis, corresponding to crosstalk between vessels and bones (Cianciolo et al., 2014; Nakahara et al., 2017; Nicoll et al., 2016).

Age-related OP in patients has a multifactorial etiology. Decreased bone formation, caused by age-related changes in levels of reactive oxygen species (ROS), insulin-like growth factor-1 (GF-1), and parathyroid hormone (PTH), plays a predominant role in the pathogenesis of age-related OP. The frequent coexistence of OP and vascular calcification has led to the hypothesis of common pathways. A growing body of evidence suggests that secretory proteins belonging to the TNF receptor superfamily, which were initially associated with bone mineral density regulation, play an important role as mediators of inflammation, vascular remodeling and vascular calcification (Vassalle & Mazzone, 2016). The discovery and characterization of the cytokine receptor-cytokine-decoy receptor triad formed by receptor activator of RANKL–RANK–OPG have led to important advances in our understanding of the biology of bone homeostasis and of the relationship between immunity and various cardiovascular diseases (Walsh & Choi, 2014). Several molecules involved in the immune system have also been shown to have essential functions in bone turnover (Weitzmann & Ofotokun, 2016) and vessels (Pober & Tellides, 2012). Various proteins are implicated not only in the balance between bone formation and resorption but also in vascular calcification. The mechanisms that regulate vascular calcification are complex: inflammatory and metabolic factors all affect these processes. OPG, an amino-acid signal peptide identified in 1997 (Simonet et al., 1997), appears to play a very important role in the crosstalk between bones, vessels and the heart (Harper et al., 2016). The molecular mechanisms involved in the regulation of vascular calcification are still not fully delineated and there are conflicting reports concerning the role of OPG in vascular and heart function in normal and pathological conditions (Sage, Tintut, & Demer, 2010).

3. Overview of vascular calcification (Figs. 1 and 2)

Vascular calcification is a risk factor of cardiovascular and all-cause mortality in diseased patients. However, the molecular basis of vessel mineralization remains unclear. Ectopic vessel mineralization can occur in the tunica intima or in the tunica media of the vessel and is associated with atherosclerosis resulting in atherosclerotic plaques. Calcification can also occur in the media and is present in the elderly and in patients with OP, CKD, or diabetes mellitus. One major hypothesis of vascular calcification is that it is a consequence of active bone formation in situ by osteoblast-type cells. VSMCs are major precursors contributing to osteochondrogenesis and calcification in atherosclerosis. The vascular wall contains osteoclast precursors in the form of monocytes, and a trans-differentiation process gives VSMCs an osteogenic phenotype (Persy & D'Haese, 2009). Vascular calcification is an active cell-mediated process and like osteogenesis it involves the expression of bone-related proteins, such as alkaline phosphatase (ALP) and Runt-related transcription factor-2 (Runx2), which are initiators of bone mineralization and SMC differentiation. The expression of ALP has been demonstrated in calcified atherosclerotic lesions (Shioi et al., 2002). SMC-specific Runx2 plays critical roles in both osteoblastic differentiation and the maturation of chondrocytes during atherosclerosis-induced vascular calcification (Lin et al., 2016). Furthermore, the Wnt/b-catenin axis regulates Runx2 expression thus controlling osteoblast

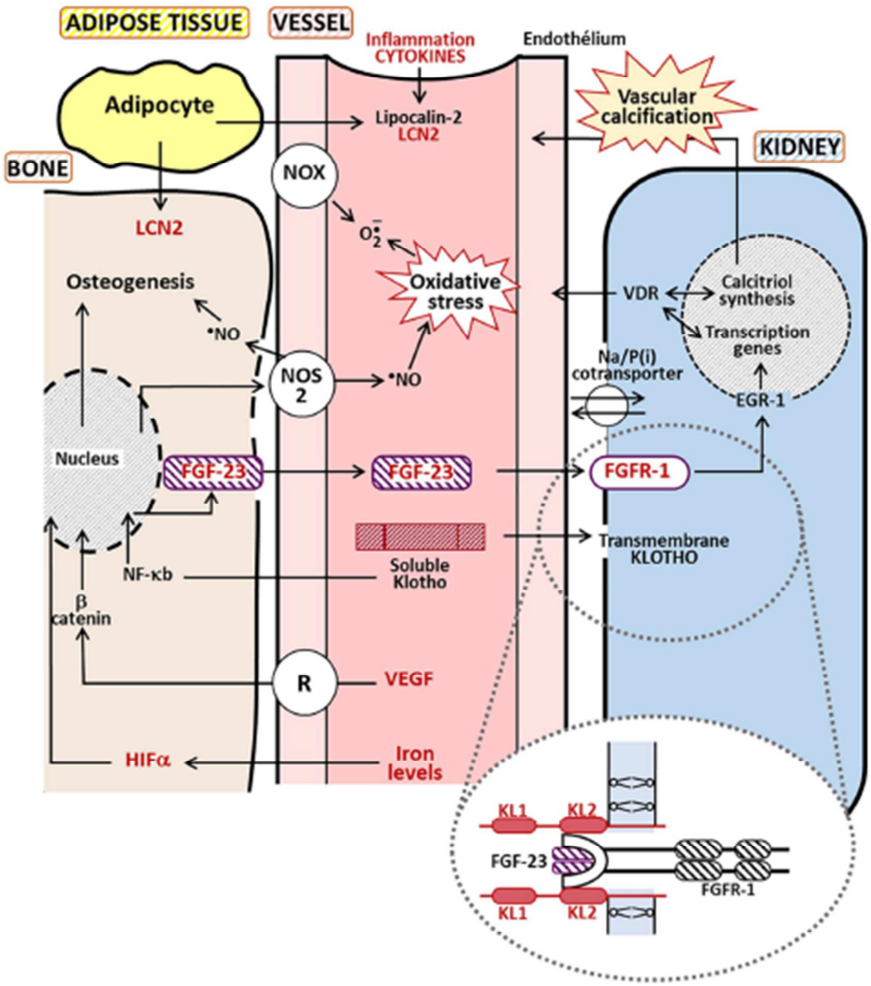


Fig. 1. Summary of the interactions between various tissues: adipose tissue, bone, vessel and kidney mediated by osteoprotegerin (OPG), FGF-23, soluble Klotho, VEGF, and oxidative stress, nitric oxide (NO), superoxide and iron.
Lipocalin-2 (LCN2) is an adipokine with specific lipid-binding activity and released from various cells during inflammation. It regulates bone homeostasis. Nitric oxide (NO) produced by NOS-2 in osteocytes and by the endothelium of the vessels integrated in bone is an important regulator of bone response to mechanical stress. Vascular endothelial growth factor (VEGF), beta-catenin, and hypoxia-inducible factors (HIFs) are implicated in osteogenesis and angiogenesis. The major sources of ROS in ECs are enzymes such as NADPH oxidases (NOX) and the mitochondria. Klotho is a protein highly expressed in the kidney. Membrane Klotho protein acts as co-receptor for fibroblast growth factor-23 (FGF-23). Klotho interacts with fibroblast growth factor receptors (FGFR-1) to form a high-affinity for FGF-23. Proteins exist consisting of two extracellular β-glucosidase-like domains (KL1 and KL2). The kidneys produce calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol): the hormonally active metabolite of vitamin D. The effects of calcitriol are mediated by its interaction with the calcitriol receptor (vitamin D receptor: VDR). The transcription factor, early growth response 1 (EGR-1) plays a pivotal role in calcitriol metabolism, and its expression is regulated by the functions of EGR-1 and FGFR-1.

differentiation. In osteoblasts, as reported above, the Wnt/b-catenin pathway controls the expression of OPG and RANKL, thus contributing to the regulation of osteoclasts (Haxaire, Hay, & Geoffroy, 2016). VSMCs synthetize much greater amounts of OPG than do ECs and play a significant role in the progression of vascular calcification as do adventitial myofibroblasts and pericyte-like calcifying vascular cells (Johnson, Leopold, & Loscalzo, 2006).

Calcified lesions contain many bone matrix proteins, such as collagen type I, osteocalcin, osteonectin, osteopontin, Gla-protein, and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) (Giachelli et al., 1993). The correlation between increased aortic ALP activity and the aortic calcification area in OPG −/− mice suggests that OPG plays an anti-calcification role through the downregulation of ALP activity (Orita et al., 2007). The roles of a variety of bone-related proteins, including ALP, BMP-2 and Gla, are complex and interactive.

Concerning the clinical domain, numerous studies have reported higher serum OPG levels in association with poorer cardiovascular outcomes in the contexts of coronary diseases (CAD), abdominal aortic aneurysms, and cardiovascular mortality. The studies demonstrated that an increase in the serum OPG level is a predictor of cardiovascular

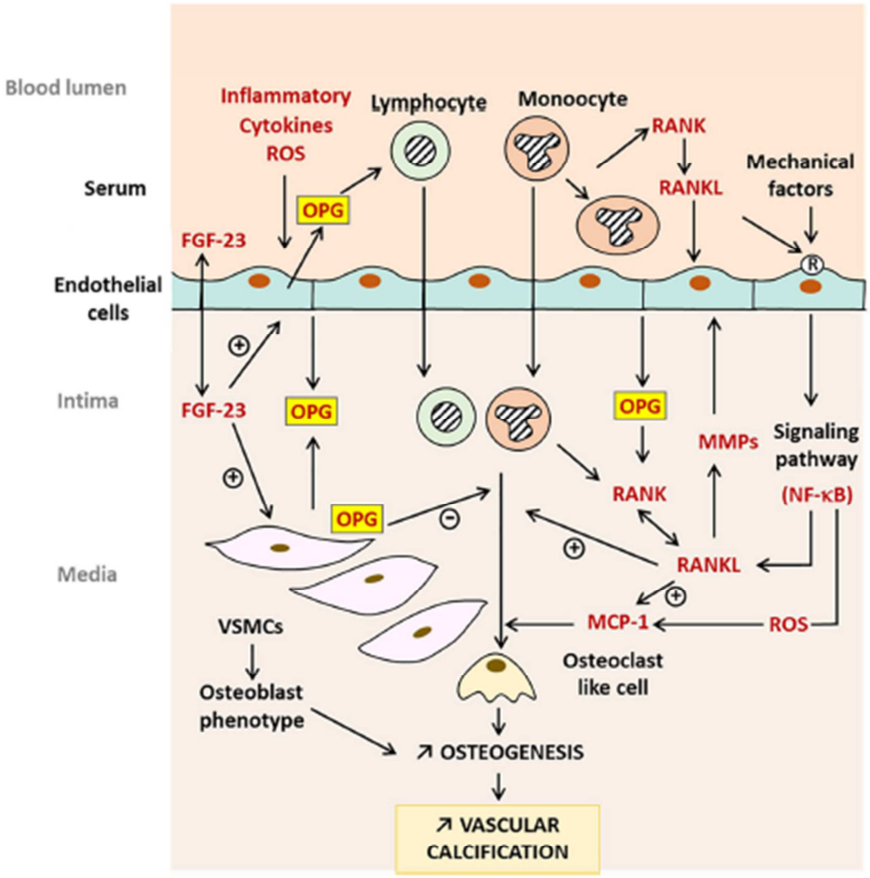


Fig. 2. Critical role of OPG/RANK/RANKL axis in the pathogenesis of vascular calcification.
In the vasculature, RANKL–RANK–OPG signaling can be stimulated by various factors including inflammation, and reactive oxygen species (ROS). RANKL binds to the RANK receptor and activates the transcription factor nuclear factor κB (NF-κB). In the presence of proinflammatory cytokines, the expression of endothelial cell (EC) adhesion molecules is increased, and is associated with the transmigration of lymphocytes and monocytes into the vessel wall. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) mediates the inhibition of osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and the induction of OPG gene expression in the cells. The production of osteoprotegerin (OPG) in VSMCs and ECs is enhanced by inflammatory cytokines. OPG operates as a decoy receptor for RANKL and prevents RANK signaling and deposition of a mineralized matrix. OPG inhibits osteoclastogenesis. RANKL significantly increases the activity of matrix metalloprotease (MMP) in VSMCs. OPG neutralizes the effect of RANKL on the induction of MMP activity in VSMCs by inhibiting its binding to RANK. Inflammation and oxidative stress are two interacted factors that induced vascular calcification; driving the transition from VSMC to osteoblast phenotype. The differentiation of monocytes to osteoclast like cell is mediated by the monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), which involves production of ROS.

mortality in patients with stable CAD (Jono et al., 2010; Venuraju, Yerramasu, Corder, & Lahiri, 2010). In a 10-year follow-up survey, serum OPG levels were found to be an independent risk factor for the progression of atherosclerosis as well as the incidence of and mortality from cardiovascular disease (Kiechl et al., 2006). Human studies have demonstrated a favorable role of TRAIL in cardiovascular diseases such as heart disease, coronary atherosclerosis and coronary disorders (Deftereos et al., 2012; Niessner et al., 2009). OPG levels are associated with carotid intima-media thickness in CAD patients. OPG predicts early carotid atherosclerosis in patients with CAD (Montecucco, Steffens, & Mach, 2007; Morisawa et al., 2015).

In CKD patients, vascular calcification is frequent and the prognosis is similar to that for cardiovascular mortality. In CKD patients, it is suggested that increased OPG levels in kidney disease patients is the result of impaired renal clearance. In dialysis patients, vascular calcification is always present (Jono, Shioi, Ikari, & Nishizawa, 2006). OPG, RANKL and TRAIL concentrations were measured in hemodialyzed CKD patients. Plasma OPG concentrations were higher in CKD patients than in controls whereas total soluble RANKL was lower. The OPG/RANKL ratio was therefore higher in these patients. In contrast, soluble TRAIL concentrations did not differ between the groups. Recent studies have confirmed the role of OPG as a predictor of mortality in CKD (Alderson et al., 2016; Kuzniewski et al., 2016).

Different factors significantly correlate with serum OPG levels in patients with CKD. Increased serum levels of OPG in dialysis and pre-dialysis patients with chronic renal failure compared with renal transplant patients and controls were studied. In the patient groups receiving two dialysis treatments, the levels of OPG were even higher, signifying major vascular injury (Demir et al., 2016). Increased levels of OPG in dialysis patients may be related to uremic stimulation and the dialysis procedure. Recent studies demonstrated the effects of PTH and vitamin D acting in synergy with fibroblast growth factor 23 (FGF-23) on the

within or in the proximity of VSMCs. It is detected at very low levels in the brain, placenta, and skeletal muscle (Schoppet et al., 2007; Simonet et al., 1997). Patients with carotid calcification in carotid artery disease had an increased serum OPG concentration. It could thus be hypothesized that OPG plays an important role in arteriosclerosis-related calcification.

OPG is released under basal conditions by ECs upon stimulation with inflammatory cytokines, hormones and various circulating compounds. TNF-α and IL-1β were found to increase OPG levels. Within ECs, OPG is associated with von Willebrand factor (vWF) within secretory granules called Weibel-Palade bodies (WPBs). Upon stimulation with TNF-α or interleukin-1β (IL-1β) in vitro, the OPG-von Willebrand factor complex is secreted into the surrounding medium. This complex is present in human serum, indicating that EC activation by cytokines is one of the possible sources of circulating OPG in patients with diseases associated with inflammatory processes, such as atherosclerosis or diabetes (Zannettino et al., 2005). The multimeric size of vWF can be controlled by the glycoprotein, thrombospondin-1 (TSP-1). The identification of several classes of roof-plate-specific spondin (RSPO: R-spondins) receptors indicates that this family of proteins can affect several signaling cascades. VWF reductase activity was present in the (Ca^{++})-binding repeats and C-terminal sequence of TSP-1 (Pimanda et al., 2002). TSP-1 is an important extracellular matrix component that influences the function of VSMCs, ECs, fibroblasts and inflammatory cells with important implications for cardiovascular diseases. TSP1, via its necessary receptor CD47, inhibits nitric oxide (NO)-stimulated soluble guanylate cyclase activation in VSMCs (Bauer et al., 2010; Krishna & Golledge, 2013). The OPG/TSP-1 tandem is implicated in the failure of pancreatic β-cells, thus initiating the pathogenesis of type 2 diabetes. It has been demonstrated that TSP-1 plays an important role in β-cell survival during lipotoxic stress in rat, mouse and human models. TSP-1 acts from within the endoplasmic reticulum to activate nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2), inducing a protective antioxidant defense response against lipotoxic stress (Cunha et al., 2016). Nrf2 signaling modulates many physiological and pathophysiological processes, such as lipid homeostasis, atherosclerosis, diabetes, redox regulation and inflammation (Mimura & Itoh, 2015; Rochette et al., 2013; Rochette, Zeller, Cottin, & Vergely, 2014). Activation of the p53 pathway down-regulates OPG expression and the release by vascular ECs (Secchiero et al., 2008).

In vitro, bone marrow mesenchymal stem cell (MSC)-derived vascular SMC released higher levels of OPG into the culture supernatant. OPG acts as an autocrine/paracrine growth factor for vascular SMC; its effects might contribute to the progression of calcification in the vessel during atherosclerosis (Corallini, Gonelli, D'Aurizio, di Iasio, & Vaccarezza, 2009).

Important observations are that vascular calcification is often greater in patients with osteoporosis, independently of age, and that a deficiency in OPG leads to calcification (Bucay et al., 1998; Sage et al., 2010). These results demonstrate a distinct mechanism of bone and vascular calcification and a tissue-specific function of OPG in atherosclerosis progression (Schweighofer et al., 2016).

An association between OPG and aneurysm development in human abdominal aortic aneurysm (AAA) has been demonstrated. Immunodetection of OPG in abdominal aorta aneurysm biopsies localized the protein primarily within the fragmented arterial media, where it was associated with an infiltration of inflammatory cells: monocytes/macrophages (Moran et al., 2005). The concentration of OPG in the aortic wall is positively related to established markers of AAA severity and pathogenesis (Koole et al., 2012).

4.1.3. Genetic aspects

Few studies have focused on the direct association between OPG genetic polymorphisms and various pathologies. OPG has traditionally been implicated in bone remodeling and OP. There is now emerging evidence that OPG polymorphisms participate in the pathogenesis of cancers, atherosclerosis and cardiovascular diseases.

A number of polymorphisms of the OPG gene in the promoter region, in exons 1–5, and in introns 1–4, including polymorphisms 149 T → C, 163 A → G, 209 G → A, 245 T → G, 950 T → C (all promoter), 1181 G → C (exon 1), and 6890 A → C (intron 4) have been described in different diseases. Each polymorphism has been evaluated in specific diseases. For example, the frequency of the OPG gene single nucleotide A163G polymorphism has been studied in diabetic patients with microvascular and macrovascular complications. It has been reported that changes in serum OPG levels are influenced by genetic polymorphisms, including 950 T/C at the rs2073617 locus and, 1181 G/C at the rs2073618 locus (Vidal, Formosa, & Xuereb-Anastasi, 2011). The 1181 G → C polymorphism is located in the upstream region of exon 1, which encodes the signal peptide of the OPG protein and results in a lysine to asparagine substitution.

Polymorphism in the promoter region of the human OPG gene may contribute to the genetic regulation of bone mass (Hofbauer & Schoppet, 2002). Polymorphism in the OPG gene correlates with mineral density of the lumbar vertebrae in postmenopausal women (Zhao et al., 2005). One consequence of specific mutations may be diseases which manifest as bone deformation and abnormal ossification (Arko, Prezelj, Kocijancic, Komel, & Marc, 2005).

Numerous studies have been designed to assess the association between gene polymorphisms of the OPG gene, the serum OPG level, and the development of atherosclerosis in the presence or absence of rheumatoid arthritis (RA). In this field, recent results suggest that a polymorphism of the TNFRSF11B gene is associated with the presence of coronary atherosclerosis in patients with RA (Chung et al., 2015; Genre et al., 2014). A number of polymorphisms of the OPG gene (including polymorphism genotypes 950 TC/1181 GC and 950 CC/1181 CC) have been found in patients with coronary artery disease. Serum OPG levels correlated with the presence of a C allele at position 950. Genotypes 950 TC/1181 GC and 950 CC/1181 CC were overrepresented in men with CAD (Soufi et al., 2004). In a Swedish cohort, the homozygous polymorphism 950 CC was found to be concurrently associated with increased intima-media thickness in the common carotid artery and reduced maximal post-ischemic forearm blood flow, both of which are early structural and functional indicators of atherosclerosis (Brandstrom et al., 2002).

Concerning metabolic diseases such as metabolic syndrome and diabetes, the results of recent studies suggest that OPG gene polymorphism may play an important role in the initiation and outcome of these diseases. The frequency of the OPG gene single nucleotide A163G polymorphism and its association with diabetic microvascular and macrovascular complications has been studied. The mechanisms underlying the regulation of OPG levels, OPG polymorphism and metabolic diseases are currently not fully elucidated. Statistical analysis showed no significant difference in the distribution of the OPG A163G polymorphism in diabetic patients and control groups (Guo, Hu, Zhang, Wang, & Liu, 2013; Perez de Ciriza et al., 2014; Soysal-Atile et al., 2015).

4.2. Biochemistry and functions of RANKL

RANKL is mainly expressed on infiltrating T cells and activated ECs. RANK is expressed on monocytic osteoclast precursors and dendritic cells. RANKL plays an important role in immune responses. RANKL and RANK are undetected in non-diseased human vessels, while OPG is expressed in normal arteries (Mogelvang et al., 2013; Van Campenhout & Golledge, 2009).

RANKL-RANK complexes are likely to be internalized via rafts and then degraded in lysosomes. Human RANK consists of 616 aa (Fig. 3). These aa are divided into a C-terminal cytoplasmic domain of 383 aa, an N-terminal extracellular domain of 184 aa, a signal peptide of 28 aa and a transmembrane domain of 21 aa, which contains four cysteine and two N-glycosylation sites.

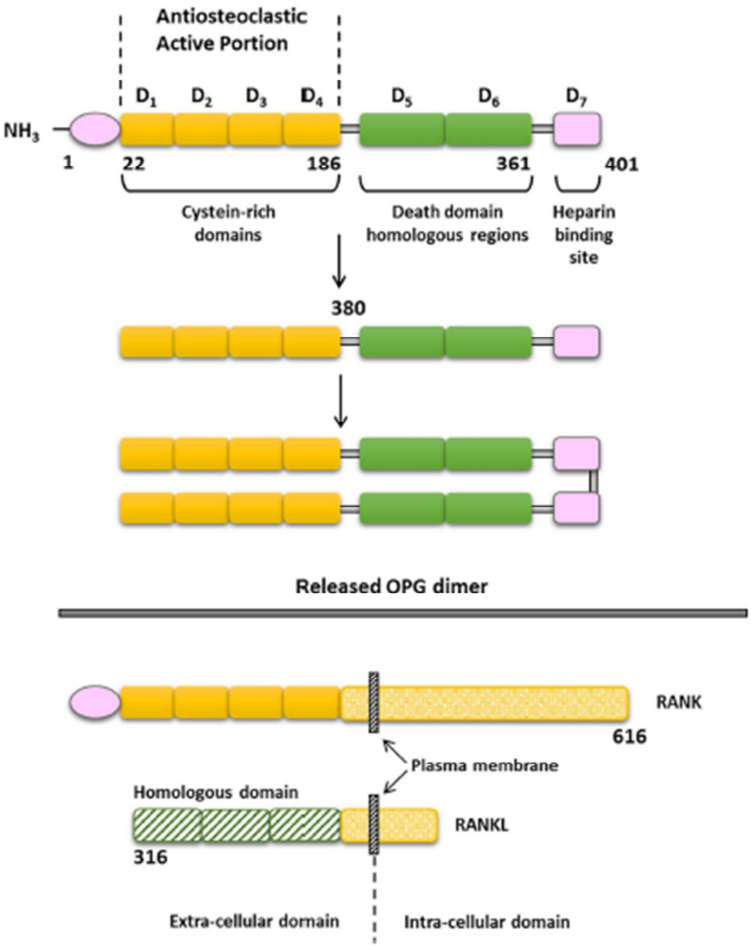


Fig. 3. Molecular structure of osteoprotegerin.
Osteoprotegerin (OPG) is composed of 401 amino acid residues of which 21 are a signal peptide which is cleaved, generating a mature form of 380 amino acids. The N-terminal part of OPG is a cysteine-rich domain important for dimerization whereas the C-terminal contains a death domain and a domain for heparin binding. Circulating measurable OPG exists either as a free monomer of 60 kD and a disulfide bond-linked homodimer form of 120 kD, or as OPG bound to its ligands, namely RANK Ligand (RANKL). OPG consists of 7 structural domains, of which the amino-terminal cysteine rich domains 1 to 4 (D1–D4) are necessary for binding to RANKL. The carboxy-terminal portion of the protein contains two regions (D5 and D6). In domain 7 (D7) at position 400 exists an unpaired cysteine residue implicated in disulfide bond formation and dimerization. RANKL binds to RANK on target cells, which triggers activation of nuclear factor κB (NF-κB), resulting in its translocation to the nucleus. RANK is a transmembrane protein that is expressed on osteoclasts.

Human and murine RANKL proteins share 83–87% homology, with the largest murine transmembrane isoform comprising 316 aa. Sequence analysis of the murine RANKL gene (316 aa) compared with the human RANKL gene (317 aa) showed two potential N-glycosylation sites in the extracellular domain at amino acid fragment positions 197 and 263 (Wright, McCarthy, Middleton, & Marshall, 2009). RANKL contributes to vascular calcification by regulating bone morphogenetic protein-2 and matrix Gla (gamma-carboxyglutamic acid) protein expression (Schurgers, Cranenburg, & Vermeer, 2008). These actions were counteracted by estrogen in a receptor-dependent manner (Osako et al., 2010).

RANKL is a transmembrane protein, but a soluble form (soluble RANKL; sRANKL) also circulates in the blood. sRANKL is thought to be produced by cleavage of membrane RANKL or secreted by T-lymphocytes. Membrane-bound RANKL (mRANKL) or sRANKL binds to RANK via interaction with specific proteins: tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) proteins. TRAFs are signal transducers of an extensive variety of other receptor families, including innate immune receptors. Receptors of the TNF-R superfamily have open tissue distribution and regulate diverse biological functions. TRAFs bind to the intracellular domains of various receptors of the TNFR superfamily. One of the important roles of TRAFs in RANK–RANKL signaling is the activation of NF-κBs, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and interferon-regulatory factors (IRFs). TRAF molecules may also contribute to chronic inflammation and infection (Xie, 2013).

OPG has also been noted to bind to TRAIL. TRAIL is expressed as a type II transmembrane protein. The extracellular domain of this protein can be cleaved proteolytically from the cell surface to act as a soluble cytokine. TRAIL acts by binding to 4 TRAIL receptors. The biological consequence of the TRAIL/OPG interaction is the inhibition of TRAIL-induced apoptosis in numerous cancer cells. This mechanism could lead to impaired apoptosis (Neville-Webbe et al., 2004). The RANKL/RANK/TSP/TRIAL system is important but it appears that other signals expressed in tissues are implicated in the regulation, proliferation, and osteoblastic differentiation of calcifying vascular cells.

In this context, IGF-1, IGF-2 and, IGF receptor (IGFR) signals appear to be critical for the homeostasis of cells, including VSMCs. The IGF system has been implicated in a range of diseases, including atherosclerosis, diabetic complications, cardiovascular diseases and cancer. IGF binding to the IGF-1 receptor results in the activation of a number of signaling pathways, including Ras/Raf/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-k)/Akt. Calcium-induced OPG regulates IGF-1R

expression in VSMCs, and protects against calcium-inducible calcification (Di Bartolo et al., 2011). IGF-1R activity and expression modulate VSMC calcification. There is a feedback mechanism involving calcium signaling and regulation of IGF-1R expression via OPG. IGFs play a significant role in the physiology of ECs by promoting migration, and by inducing NO production. These actions are mediated by IGF receptors. IGF-1 acts as a vasodilator in vivo (Higashi, Sukhanov, Anwar, Shai, & Delafontaine, 2010). Depletion of the IGF-1 receptor may contribute to EC apoptosis induced by advanced glycation end products (AGEs) (Pan et al., 2014). ECs express IGF and insulin receptors (including the IGF-1 receptor) and are responsive to IGFs (Bach, 2015; Chisalita & Arnqvist, 2004).

Concerning skeletal metabolism, IGF-1 is a potent regulator of bone homeostasis as reported previously. IGF-1 plays an important role in bone remodeling; it is produced by osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes acting in an autocrine or paracrine manner (Fulzele & Clemens, 2012; Wang et al., 2006). Hormonal, immune, and metabolic pathways affect the dynamics of osteocyte turnover. Interestingly, it has been reported in recent studies that the gut microbiota could affect these pathways (Charles, Ermann, & Aliprantis, 2015). Gut microbiota induce IGF-1 and thus promote bone formation and growth (Yan et al., 2016). Manipulation of the microbiome with probiotics as a target in diseases is attracting major attention (Ejtahed, Soroush, Angoorani, Larijani, & Hasani-Ranjbar, 2016).

4.3. Biochemical crosstalk between endothelial cells and osteocytes

Recent studies have elucidated the crosstalk between EC and osteoblasts during osteogenesis, thus coupling angiogenesis and osteogenesis. The mammalian skeleton supports stem and progenitor cells that permit lifelong hematopoiesis and osteogenesis; these processes rely on niche microenvironments. The ability of stem cells to reside within niches is important (Kusumbe, Ramasamy, & Adams, 2014). Recent findings have identified the endothelial Notch as a key positive regulator of angiogenesis and osteogenesis in bone (Ramasamy, Kusumbe, Wang, & Adams, 2014). Several factors contribute to the molecular interactions between ECs and osteogenic cells. Among endogenous factors, IGF-1, vascular endothelial growth factors (VEGFs), lipocalin-2 (LCN2) and NO pathways have been the most widely studied.

4.3.1. IGF-1

IGF-1 signaling regulates numerous physiological functions: metabolism, hypertrophy, senescence and apoptosis in the heart. IGF-1 deficiency is associated with an increased risk of cardiovascular disease, whereas cardiac activation of IGF-1 receptor (IGF-1R) protects against the harmful effects of a high-fat diet and myocardial dysfunction (Troncoso, Ibarra, Vicencio, Jaimovich, & Lavandero, 2014). Calcium-induced OPG regulates IGF-1R expression (Di Bartolo et al., 2011). Interestingly, OPG-inducible IGF1R expression is biphasic: low (physiological) OPG concentrations were able to up-regulate IGF-1R, while high (pathological) OPG mimic the high circulating OPG levels detected in patients with vascular disease (Di Bartolo et al., 2011).

4.3.2. VEGFs

VEGFs promote EC survival by stimulating the formation of a multiprotein transmembrane complex that includes VEGF receptor 2 (VEGFR-2). VEGFs increase bone mass through a VEGFR 2- and PI3-kinase-mediated pathway, which induces β-catenin transcriptional activity. This molecular mechanism exists in endothelial and osteoblastic cells. Earlier findings established that VEGF-induced effects were mediated by enhanced stabilization and transcriptional activity of β-catenin in endothelial and osteoblastic cells (Maes et al., 2010).

4.3.3. LCN2

LCN2, also called neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and siderocalin, is mainly released from adipocytes. LCN2 is an adipokine with specific lipid-binding activity. It acts as a lipid chaperone to promote lipotoxicity in ECs. Elevated local levels of LCN2 participate in the pathogenesis of cardiovascular dysfunction (Wu et al., 2014). Bone can be exposed to a variety of stresses, including trauma, loading and unloading. The adaptation of bone to unloading is regulated by coordinated molecular mechanisms. Recent studies have investigated the role of LCN2 as a new mechano-responding gene that regulates bone homeostasis and could be involved in the initiation of osteoporosis induced by mechanical loading due, for instance, to ageing (Rucci et al., 2015). The role of LCN2 in bone metabolism is still unclear; however, it is now well demonstrated that LCN2 appears to be a useful clinical biomarker in inflammatory diseases in relationship with EC-osteoblast coupling (Veeriah et al., 2016).

4.3.4. Nitric oxide (NO)

The recent advances in our understanding of osteogenesis have provided significant information about the role of NO in bone formation. Endothelial NO synthase (eNOS) is widely expressed in bone on a constitutive basis, whereas inducible NOS (iNOS) is expressed in response to inflammatory stimuli (van't Hof & Ralston, 2001). Interestingly, proinflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-1β, IL-8, and IL-17, are involved in the up-regulation of iNOS expression in inflammatory bowel diseases.

NO produced by osteocytes and by the endothelium of the vessels integrated in bone is an important regulator of bone response to loading. In addition, NO is able to mediate osteoclast activity. Concerning the response to loading variations, recent results show that ECs and osteoblasts share the same key transcription factor, NF-κB. In ECs, NF-κB is directly activated by low mechanical strengths and induces NOS 2 and expression of the pro-inflammatory cytokine IL-1β. In osteoblasts, NF-κB is activated by the IL-1β released by unloaded ECs and induces NOS (Veeriah et al., 2016). Transcriptional responses are central to the maintenance of endothelial homeostasis during variations of blood flow including pulsatile flow and spatial-varying shear stress. Concerning the role of the vascular endothelium, shear stress has been implicated in the reactivation of developmental genes, implicating Wnt and Notch signaling, for vascular development and repair. The characteristics of hemodynamic shear forces, which modulate mechano-signal transduction, influence metabolic effects and thus vascular function (Lee, Packard, & Hsiai, 2015). In this context of hemodynamic adaptation, ROS play a modulator role in ECs as signaling molecules to mediate various biological responses such as gene expression, cell proliferation, and senescence. The major sources of ROS in ECs are enzymes such a NADPH oxidase (NOX) and xanthine oxidase, and the mitochondria (Frey, Ushio-Fukai, & Malik, 2009; Oudot et al., 2006).

Another major role of NO in the vessel is in the regulation of calcium metabolism. Complex pathological mechanisms are involved in the dysfunction of calcium homeostasis that leads to the development of vascular calcification. As mentioned above, the mechanisms that regulate vascular calcification are complex. Vascular calcification and OP appear in ageing, and during diseases such as diabetes mellitus and chronic kidney disease (CKD). Recent studies showed that NO inhibited VSMC calcification and osteoblastic differentiation of VSMCs (Kanno et al., 2008; Veeriah et al., 2016).

In the concept of EC-osteoblast crosstalk, one major challenge is perhaps to evaluate the importance of intercellular communication, which can be mediated through 1) direct cell-cell contact, 2) transfer of secreted molecules, and 3) extracellular vesicles (EVs). Numerous studies have demonstrated that several bioactive molecules, such as microRNAs (miRNA), mRNAs, proteins and lipids, are trafficked with EVs. Very biological functions have been attributed to EVs (Raposo & Stoorvogel, 2013). In serum and plasma, miRNAs are present in a highly stable, cell-free form and play important roles in bone homeostasis, such as the regulation of osteoblast and osteoclast differentiation. Some miRNAs have been identified as potential biomarkers in

patients with postmenopausal osteoporosis (Tang, Xiong, Ge, & Zhang, 2014). The identification and targeting of EV-associated miRNAs are emerging as a new therapeutic strategy in skeletal and vascular diseases.

5. Osteoprotegerin and pathophysiology

5.1. Approach via genetic manipulations in animal and human genetic data

The development of transgenic technologies in mice and rats has made it possible to study the consequences of genetic alterations using knockout or overexpression of specific genes on cardiovascular and metabolic functions. Particularly important has been the advance in knowledge of the role of OPG, RANKL and RANK via the selective targeting of genes and our understanding of interactions of different systems such as bone metabolism and cardiovascular functions. Overexpression of OPG in transgenic mice leads to profound osteopetrosis. Osteopetrosis is a disorder characterized by a defect in osteoclastic bone resorption. In contrast, in mice, ablation of the OPG gene causes severe osteoporosis. Suppression of RANK produces profound osteopetrosis, indicating the important physiological role of this protein in regulating bone resorption. OPG-deficient mice (OPG −/−) exhibited an overall decrease in total bone density and a high incidence of fractures (Bucay et al., 1998; Simonet et al., 1997). The central roles of RANKL and RANK in determining the level of bone resorption were demonstrated through the generation of transgenic mice: RANKL −/− and RANK −/− mice were osteopetrotic due to the absence of osteoclasts (Blair, Zhou, Seibel, & Dunstan, 2006). OPG protein and transgenic overexpression of OPG in OPG −/− mice rescued the osteoporotic bone phenotype observed in OPG-deficient mice. However, intravenous injection of recombinant OPG over a 4-week period could not reverse the arterial calcification observed in OPG −/− mice (Min et al., 2000). Renal and aortic calcification is observed in OPG knockout mice, indicating that OPG protects large blood vessels against medial calcification (Bucay et al., 1998).

Concerning cardiac disease associated with ageing, both 2.5- and 12-month-old OPG −/− mice, presented a higher systolic blood pressure and a greater heart weight/body weight ratio than age-matched WT mice; suggesting that OPG plays a role in preserving heart structure and its evolution with ageing (Hao et al., 2016). Evidence indicates that the OPG/RANK/RANKL triad also plays a role in the cardiovascular system (Bucay et al., 1998). In hypercholesterolemic Ldlr −/− mice, exogenous OPG does not inhibit the development of atherosclerosis, but prevents calcification of the aorta (Morony et al., 2008). Hypercholesterolemic Ldlr(−/−) ApoB (100/100) mice develop calcific aortic stenosis and valvular cardiomyopathy in old age. Exogenous OPG protects aortic valve function in these genetic mice, which develop calcific aortic stenosis. Mechanisms by which OPG reduces valve calcification can be deduced from its inhibition of RANK/RANKL signaling (Weiss et al., 2013). In conclusion, genetic manipulations demonstrated that OPG −/− mice developed vascular calcification of large arteries associated with osteoporosis and cardiovascular diseases; the injection of recombinant OPG partly reversed these actions.

In recent years, mutations causing severe alterations in bone density were identified in groups of patients. Moreover, evaluation of the presence of polymorphisms and their effects on bone tissue in postmenopausal women provided insights into the pathophysiology of osteoporosis. The association of the polymorphisms associated with bone mineral density has been investigated in various studies. In patients with 1181GC polymorphism, it has been demonstrated that a change in nucleotides was related to the impaired secretion of OPG (Boron et al., 2015).

Similar findings have been observed in the chronic bone disorder, Paget's disease; it is a common disease of the bone associated with abnormal bone turnover due to an imbalance between osteoclastic and osteoblastic activity. The disorder is associated with excessive bone resorption, followed by skeletal deformity. Most patients with juvenile Paget's disease are homozygous for mutations in the TNFRSF11B gene, which results in a deficiency of OPG (Naot et al., 2014).

5.2. OPG: an inhibitory factor of osteoclastogenesis

In the aged population, osteoporosis is a major cause of fractures and associated morbidity. Its pathogenesis is multifactorial: chronic inflammation and endocrine mechanisms, associated with alterations of the immune system. Osteoporosis results from a predominance of osteoclast over osteoblast activity. Numerous studies demonstrated the importance of OPG in protecting against bone resorption in bone-related diseases (Boron et al., 2015; Pietschmann, Mechtcheriakova, Meshcheryakova, Foger-Samwald, & Ellinger, 2016). The OPG/RANKL/RANK axis has been identified as a candidate mediator for paracrine signaling in bone metabolism. OPG prevents calcification but is not able to reverse vascular calcification once it has occurred.

As we reported previously, the OPG/RANKL/RANK triad plays an important function in osteogenesis and the expression of RANKL in bone cells is stimulated by various cytokines, hormones such as PTH, estrogens and 1,25 dihydroxy-vitamin D3. Concerning female hormones, there is clear evidence of the relationship between estrogen deficiency and an accelerated loss of bone mass. RANKL expression in B lymphocytes, but not T lymphocytes, contributes to the loss of trabecular bone caused by estrogen deficiency (Manolagas, O'Brien, & Almeida, 2013). The presence of nuclear estrogen receptors in human osteoblasts has been proven. Two types of estrogen receptors (ERs) have been described: receptor α (ER-α) and receptor β (ER-β). Estradiol stimulates OPG expression in osteoblasts via ERα (Wilson & Westberry, 2009).

Concerning postmenopausal osteoporosis, studies have been performed to determine whether an association exists between serum OPG levels and BMD in postmenopausal women. Serum OPG was found to be independently associated with osteoporosis and the presence of vertebral fractures (Mezquita-Raya et al., 2005). The selective-estrogen receptor modulator, raloxifene, is able to increase OPG serum levels in postmenopausal women with low BMD (Messalli et al., 2007). In conclusion, the protective role of OPG was demonstrated by its protective action against bone resorption in the bone-related diseases of postmenopausal women.

In the protective role of OPG against bone resorption, it is important to consider the mechanisms of osteoblastic differentiation into osteocytes. Several key proteins, such as sclerostin, fibroblast growth factor-23 (FGF-23) and the tandem: Wnt/β-catenin, have been identified. The glycoprotein sclerostin has been characterized as a negative regulator of bone growth (Moester, Papapoulos, Lowik, & van Bezooijen, 2010). The importance of Wnt signaling for bone has also been highlighted. Wnt signaling represses bone resorption through the increased secretion of OPG (Baron & Kneissel, 2013; Joiner, Ke, Zhong, Xu, & Williams, 2013; Kramer et al., 2010) (Fig. 4).

Wnt proteins are secreted cysteine-rich glycoproteins. The Wnt/β-catenin pathway plays an important role in the main processes that control osteogenesis. In the absence of Wnt stimulation, cytoplasmic β-catenin is phosphorylated and degraded by the ubiquitin-proteasome system. Upon binding of Wnt, phosphorylation of β-catenin is blocked, thus allowing it to translocate to the nucleus where it complexes with transcription factors to upregulate Wnt target gene transcription (V. S. Li et al., 2012). Wnt binds to a member of the Frizzled family of seven-transmembrane proteins, and to a low-density lipoprotein-related receptor (LRP): LRP 4, 5 or 6, leading to downregulation of GSK-3 activity and the initiation of the Wnt/β-catenin signaling cascade. LRP5 and LRP6 were originally identified thanks to their homology to the low-density lipoprotein (LDL) receptor (Joiner et al., 2013).

This pathway regulates the gene transcription of proteins that are important for osteogenic differentiation. It is also involved in regulation of the mature skeleton. As we reported previously, R-spondins have

been recognized as modulators of the skeleton. R-spondins are a family of proteins acting as agonists of the Wnt/β-catenin signaling pathway. Leucine-rich repeats containing G-protein-coupled receptors (LGR4/5/6) have been identified as the new receptors of R-spondins (Shi, Mao, Zheng, & Jiang, 2016). Concerning anabolic aspects, bone biology research showed that osteocytes produce inhibitors of the anabolic Wnt signaling pathway; there are a number of extracellular Wnt antagonists (Kubota, Michigami, & Ozono, 2009). Recently, it has been reported that LGR4, also called GPR48 (G-protein-coupled receptor 48), is a receptor for RANKL and inhibits osteoclast differentiation in vivo; the soluble LGR4 extracellular domain (ECD) binding RANKL. The importance of LGR4 and its ligands, in the regulation of Wnt signaling pathways has been established in both in vitro and in vivo studies using experimental models and human genetics analysis. Finally, LGR4 acts as a RANKL receptor that negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption (Luo et al., 2016). These pathways are now the target for therapeutic intervention.

6. Osteoprotegerin in cardio-metabolic disorders

6.1. Implication of the OPG/RANK/RANKL in heart diseases: heart failure and atrial fibrillation

In various experimental models of heart failure, significantly increased mRNA expression of OPG was noted in both the ischemic and non-ischemic myocardium compared with that in subjects without heart failure. These results demonstrated a possible role of OPG in the adaptation of the myocardium to the failure. The OPG/RANK/RANKL axis appears activated within the myocardium in the rat model of post-infarction heart failure. In cardiomyocytes, enhanced systemic expression of RANKL was accompanied by increased expression of the receptor RANK. These findings suggest a potential role for RANKL/RANK interaction in the pathogenesis of heart failure (Ueland et al., 2005). Human subjects with heart failure had significantly increased serum levels of OPG compared with healthy controls (Ueland et al., 2005). In a prospective study, it has been reported that serum OPG was directly associated with a higher probability of death or readmission for acute heart failure within 6 months, irrespective of other known prognostic markers. These findings were observed both when the ejection fraction was preserved and reduced (Frioes et al., 2015). A significant interaction was observed between OPG and NT-proBNP. A combination of high levels of both OPG and NT-proBNP, compared with a combination of low levels, was associated with a fivefold increased risk of heart failure. This is observed in male patients. Paradoxically, in women, no associations were observed. In contrast, in women, higher OPG levels were positively associated with the prevalence of hypertension, whereas body mass index (BMI) was inversely related to OPG levels (di Giuseppe et al., 2017).

The pathophysiological alterations underlying the initiation and progression of atrial fibrillation (AF) are dependent on multiple factors. They are associated with structural and electrical remodeling in cardiomyocytes of different area of the myocardium; cardiac fibroblasts are also implicated in these processes. Cardiac fibroblasts are well-established as key regulators of extracellular matrix turnover in the context of myocardial remodeling and the fibrosis associated with inflammatory process; various inflammatory cytokines and chemokines being up-regulated in AF (Dzeshka, Lip, Snezhitskiy, & Shantsila, 2015; Jalife, 2014). Among the cytokines, the role of TNF in inflammation has been extensively investigated. In this context, the potential relationship between levels of OPG or TRAIL, and arrhythmias has been explored. The first study in this field was based on the population of the Framingham Offspring Study. Among the 12 inflammatory markers tested, only OPG had a significant prognostic value in predicting the occurrence of AF (Schnabel et al., 2009). It appears that OPG and TRAIL may contribute to the pathogenesis of AF as negative and positive factors, respectively (Rewiuk & Grodzicki, 2015). One study showed that the OPG/RANK/RANKL triad is involved in the development and progression of AF, this axis being, as we reported, implicated in regulating atrial structural remodeling. AF groups had higher atrial gene expression of the OPG/RANK/RANKL axis and a higher RANKL/OPG ratio, particularly in paroxysmal AF (H. Cao et al., 2011).

TRAIL triggers non-apoptotic signals in normal cells. But apoptotic signal in several pathologic conditions. Systemic TRAIL delivery significantly reduced cardiac fibrosis and apoptosis in a mouse model of diabetic cardiomyopathy (Toffoli et al., 2012). TRAIL initiates pathways of cell death in which caspases activation in mediated either directly or indirectly via the release of apoptogenic factors from mitochondria. TRAIL induces apoptosis through the death receptors DR4/R1 and DR5/R2, which are expressed on the surface of target cells. In preclinical models, TRAIL showed anticancer activity (Labovsky, Vallone, Martinez, Otaegui, & Chasseing, 2012). In one hypothesis, the uptake and binding of TRAIL by OPG is a protective mechanism against apoptosis (Pritzker, Scatena, & Giachelli, 2004).

In conclusion, taken together, these results suggest that mediators of bone metabolism play a potential role in the initiation and development of AF via activation of the OPG/RANK/RANKL axis (Cao et al., 2013).

6.2. OPG plays a significant role in the physiology of endothelial cells

OPG enhances both VSMC and EC-survival. It directly promotes both the proliferation and migration of microvascular ECs (Cross et al., 2006). OPG is localized to WPBs and co-localized with the adhesion molecule P-selectin and the glycoprotein vWF. OPG is physically associated, as reported above, with vWF within the Weibel-Palade bodies (WPBs) of ECs and also in plasma. OPG binds with high affinity to vWF reductase, and TSP-1, and may provide a link between TSP-1 and vWF. Treatment of human umbilical vein endothelial cells with pro-inflammatory cytokines, such as TNF-alpha and IL-1beta, resulted in mobilization from the WPBs and subsequent secretion of OPG protein into the culture supernatant (Zannettino et al., 2005). In vivo, the interaction between OPG and vWF is maintained in the serum after secretion, where OPG may act to regulate the hemostatic role of vWF. OPG may also serve to modulate the extent of the inflammatory response. It can act as a survival and antiapoptotic factor for ECs (Schoppet et al., 2004). Besides, OPG increases EC proliferation in microvessels promoting neovascularization (McGonigle, Giachelli, & Scatena, 2009).

OPG has been proposed as a marker of endothelial dysfunction in early pathophysiological events. An independent positive association between OPG and asymmetric dimethylarginine (ADMA), and between OPG and arterial stiffness assessed by pulse wave velocity (i.e. both markers of endothelial dysfunction), has been reported in hypertensive patients (Tsioufis et al., 2011). OPG has been shown to induce the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1), and E-selectin on ECs and to promote leukocyte adhesion, an early step in EC dysfunction, thus supporting a pro-atherosclerotic role of OPG (Zauli et al., 2007).

The existence of actions of the RANKL/RANK/OPG system in the endothelium suggests that it may have specific functions in vascular regulation (Fig. 2). Numerous findings have demonstrated RANKL expression on endothelial and inflammatory cells (Riegel et al., 2012). RANKL significantly increased the activity of matrix metalloprotease (MMP) in VSMCs. OPG neutralizes the effect of RANKL on the induction of MMP activity in VSMCs by inhibiting its binding to RANK (Quercioli et al., 2012; Venuraju et al., 2010). MMPs and endogenous processes, such as disturbances in mineral and hormonal metabolism, play a significant role in the initial steps of vascular calcification.

7. Positive relationship between circulating osteoprotegerin, vascular damage, and metabolic diseases

It is now recognized that OPG exerts proatherogenic and

prodiabetogenic effects. OPG participates in the pathogenesis of atherosclerosis and cardiovascular diseases by amplifying the adverse effects of inflammation. Serum levels of OPG were measured in patients with cerebrovascular disease, stable angina, and CAD. However, no constant correlation was observed between OPG levels and the evolution of the CAD (Schoppet et al., 2003). OPG levels were independently associated with cardiovascular mortality, but not bone mineral density in patients suffering from cerebrovascular diseases (Browner, Lui, & Cummings, 2001). Experimental studies have evaluated the possible relationship between OPG, vascular fibrosis, markers of inflammation and fibrosis, such as fibronectin, collagen I, III, IV and transforming growth factor-β1 (TGF-β1). In ApoE(−/−) mice, recombinant human OPG induced signs of fibrosis and up-regulated the arterial expression of TGF-β1, thus supporting the pathogenic role of OPG in the initiation of atherosclerotic lesions (Toffoli et al., 2011). OPG also influences the production of other agents implicated in plaque stability, such as matrix metalloproteinases. OPG is able to stimulate metalloproteinase activity in VSMCs. In a study investigating inflammatory processes in an EC culture, OPG was triggered by inflammatory cytokines, thus leading to the expression of EC adhesion molecules (Mangan, Van Campenhout, Rush, & Golledge, 2007). This process is described in mitral valve prolapse (MVP). Circulating OPG levels were higher in MVP patients than in controls, which supports the hypothesis that OPG is involved in MVP development and progression (Songia et al., 2016).

The association of different markers, and in particular OPG, with diabetic and metabolic syndrome (MetS) complications is now demonstrated. Multiple signaling pathways contribute to the adverse effects of glucotoxicity on cellular functions (Rochette et al., 2014). In the experimental context of MetS, circulating and tissue levels of OPG were significantly increased in C57BL6 mice fed a high-fat-diet (HFD), which is an animal model for the study of MetS. OPG may trigger proinflammatory changes in adipose tissue in MetS/HFD-induced obesity (Bernardi et al., 2014).

Many studies have reported that serum OPG is significantly increased in diabetic patients. In a large observational study, plasma concentrations of OPG were higher in diabetic than in non-diabetic subjects (Browner et al., 2001; Knudsen et al., 2003; Rasmussen, Tarnow, Hansen, Parving, & Flyvbjerg, 2006). It has been suggested that the increased levels of OPG could reflect vascular damage in diabetic patients. Diabetic angiopathy is associated with linear media calcifications and it is a long-term process. As reported above, the mechanisms implicated in the development of calcifications are not precisely known. Plasma OPG levels were significantly increased only in patients with microvascular complications, suggesting that elevated plasma levels of OPG may reflect microvascular damage (Knudsen et al., 2003; Rasmussen & Ledet, 2005). Plasma OPG was higher in patients with than in those without diabetic nephropathy; OPG levels increasing with decreased kidney function. In addition, independent positive correlations were demonstrated between plasma OPG and kidney function, HbA1c and systolic blood pressure (Rasmussen et al., 2006).

Concerning obesity and MetS, their relationships with bone metabolism are complex. Obesity is traditionally viewed as favorable to bone health. The increased circulating and tissue levels of pro-inflammatory cytokines in obesity may promote osteoclast activity and bone resorption by modifying the receptor activator of the NF-κB (RANK)/RANK ligand/OPG pathway (Cao, 2011). In a clinical study, serum concentrations of OPG were significantly lower in obese patients than in normal-weight controls (Holecki et al., 2007). It has been confirmed that circulating levels of OPG are lower in obese subjects without diabetes mellitus and are negatively associated with body mass index (BMI), and waist circumference (Ashley et al., 2011). However, previous results showed that in a healthy obese population, OPG was not associated with BMI and the lipid profile (Gannage-Yared et al., 2008). This relationship has been the subject of controversial studies. The absence of a relationship between BMI and OPG has been reported in other studies (Oh et al., 2005; Uemura et al., 2008). More recently, the relationship between lipid profile and OPG levels in obese and non-obese women has been investigated. Age significantly correlated with OPG levels. After adjustment for age, only HDL-C levels, LDL-C levels, and HOMA-IR correlated with OPG levels in obese, but not non-obese women. Finally, the human studies did not resolve whether OPG should be regarded as being associated with a protective mechanism or instead indeterminate with respect to vascular disease progression (Ayina Ayina et al., 2015).

8. OPG as a potential therapeutic agent

The homeostasis process concerning OPG and RANKL plays an essential role in the pathophysiology of bone. As we reported, several studies have demonstrated the beneficial effect of OPG as a specific therapeutic agent against bone resorption as well as against arterial calcification in cardiovascular disorders. Advanced clinical trials are underway. New specific targets for the treatment of bone loss are based on the inhibition of bone resorption by osteoclasts or the stimulation of bone formation by osteoblasts.

8.1. OPG and bone diseases

As related above, bone resorption is primarily due to the activation of osteoclastogenesis and an increase in receptor activator of RANKL expression. First, OPG, used as a therapy to block RANKL, was initially successful and antibodies against OPG were developed (Tella & Gallagher, 2014). A recombinant OPG fusion protein (Fc-OPG) has been used in experimental studies. It has been employed in rat models to treat arthritis and in dogs, where it induced an increase in bone formation and enhanced healing (Bolon, Campagnuolo, & Feige, 2002; Yao et al., 2011).

In clinical trials of patients with osteoporosis, inhibition of RANK-L reduced bone loss. The human monoclonal antibody against RANK-L (Denosumab) has been approved for the treatment of osteoporosis (Tarantino et al., 2013). Denosumab targets RANKL by binding to RANKL, this drug prevents the maturation and differentiation of pre-osteoclasts and promotes apoptosis of osteoclasts (Fig. 5). In the FREEDOM study, denosumab given twice yearly for 36 months was shown to reduce the risk of new radiographic vertebral fractures by 68%, hip fractures by 40%, and non-vertebral fractures by 20% when compared to placebo (Cummings et al., 2009). Several treatments, including bisphosphonates, teriparatide (a recombinant fragment of PTH: rhPTH-1-34), raloxifene and denosumab, are available for osteoporosis and fracture prevention. The superiority of denosumab over bisphosphonates in increasing BMD could be explained by its greater anti-resorptive effect (Beaudoin et al., 2016). The potential uses of RANKL inhibitors have been explored extensively in preclinical studies. Antibodies targeting RANKL preserve bone mass and strength in preclinical models (Lacey et al., 2012).

Previously in this review, we reported that the glycoprotein, sclerostin secreted by osteocytes, was a negative regulator of bone growth. Sclerostin is an endogenous protein that inhibits osteoblast differentiation by binding to the LRP receptors. In this field, the use of sclerostin antibodies showed promising results. Anti-sclerostin antibodies such as romosozumab and blosozumab are alternative drugs. These monoclonal antibodies, which bind sclerostin, increased bone formation and decreased bone resorption. Sclerostin is now recognized as a target for osteoporosis therapy (Choi et al., 2017; Cosman et al., 2016).

Concerning the relationship between bone homeostasis and the effects of hormones, it has been proved that estrogen deficiency induced an accelerated loss of bone mass. The antiresorptive effect of estrogens on bone has been used in the treatment of postmenopausal osteoporosis. The selective-estrogen receptor modulator, raloxifene, is able

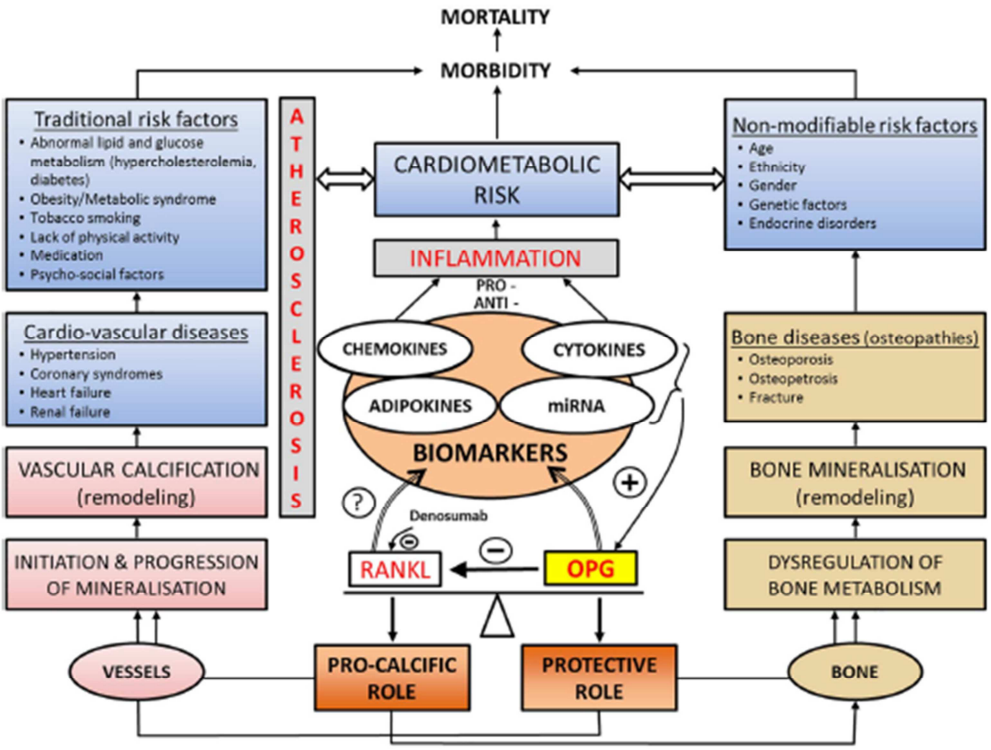


Fig. 5. Summary of the relationship between the OPG/RANKL system, the bone-vascular axis, and factors contributing to cardiometabolic risk.
Risk factors for cardiometabolic diseases are classified as non-modifiable (age, race, gender, gene and some endocrine disorders) and modifiable (traditional). The role of inflammation in cardiometabolic disorders is demonstrated. Plasma biomarkers and mediators such as chemokines, cytokines, adipokines, miRNA reflect the degree of inflammation. Vascular calcification appears to result from induction of osteogenic differentiation in vascular cells by inflammatory factors and other regulators such as RANKL and OPG. Inflammatory proteins and cytokines stimulate OPG expression, particularly in vascular wall cells. OPG inhibits vascular calcification whereas RANKL activation contributes to vascular calcification. Moreover, OPG blocks the actions of RANKL which is found increased in calcified vessels.
OPG/RANKL pathway could be a potential target for therapeutic interventions. Denosumab is a human monoclonal antibody against RANKL, inhibiting osteoclast actions. It mimics the protective OPG action.

to increase OPG serum levels in postmenopausal women with low BMD (Messalli et al., 2007).

A relationship has been reported between heparin, OPG, and bone metabolism (Theoleyre et al., 2006). Although OPG is known to bind heparin with low nanomolar affinity, in vivo studies with intravenous heparin infusions in healthy individuals showed a 2.2 fold increase in the circulating OPG levels within 5 min as compared to pre-injection values. However, the OPG levels were significantly decreased or normalized within 1 h (Nybo & Rasmussen, 2008). Heparin enhances bone resorption and induces bone loss. The results suggest that heparin promotes osteocyte-modulated osteoclastogenesis in vitro by inhibiting OPG activity (Li, Lu, Chen, Zhao, & Zuo, 2016).

8.2. OPG and therapies of vascular calcification

Vascular calcification is strongly associated with cardiovascular disease and mortality, particularly in high-risk patients with diabetes and CKD. As reported above, it has a variety of forms, including intimal calcification and medial calcification, but can also be observed in the valves of the heart. Vascular calcification is a cell-mediated process associated with VSMC death and phenotypic changes that promote vascular calcification. These processes may play a role in the accelerated vascular calcification observed in patients with CKD (Shanahan, 2013).

A variety of therapies have been tested to attempt to prevent or diminish vascular calcification. Therapies for treating vascular calcification under investigation include agents proposed as osteoporosis therapies: OPG, bisphosphonates, denosumab and teriparatide. Bisphosphonates are synthetic derivatives of pyrophosphate. There are two classes of bisphosphonates, the N-containing and, non-N-containing bisphosphonates. The presence of a nitrogen atom in the side chain in the by-products such as alendronate, pamidronate or ibandronate, enhances their affinity for bone tissue. Bisphosphonates reduce arterial wall calcification but have no effect on arterial stiffness or on cardiovascular events (Kranenburg et al., 2016).

As RANKL is thought to promote vascular muscle cell calcification, RANKL inhibition by specific agents, such as denosumab, have been tested for their ability to prevent vascular calcification (Panizo et al., 2009). In a mouse model of glucocorticoid-induced diseases, denosumab reduced the amount of calcium deposited in the aorta (Helas et al., 2009). Experimental studies demonstrated that denosumab inhibited the induced calcium deposition to basal levels in porcine valve interstitial cell culture. As reported above, calcific aortic valve disease is an actively regulated and progressive disease, characterized by a cascade of cellular changes leading to significant aortic valve stenosis. Denosumab may be a novel therapeutic approach for the clinical

cofactors, such as the chronic inflammatory state and therapeutics.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants from French Ministry of Research, INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) and, from the Regional Council of Burgundy (Conseil Régional de Bourgogne), FEDER and Association de Cardiologie de Bourgogne. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. The authors wish to thank Martine Goiset for secretarial assistance and Philip Bastable for English assistance.

References

Alderson, H. V., Ritchie, J. P., Middleton, R., Larsson, A., Larsson, T. E., & Kalra, P. A. (2016). FGF-23 and Osteoprotegerin but not Fetuin-A are associated with death and enhance risk prediction in non-dialysis chronic kidney disease stages 3–5. *Nephrology (Carlton), 21*, 566–573.

Arko, B., Prezelj, J., Kocijancic, A., Komel, R., & Marc, J. (2005). Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas, 51*, 270–279.

Ashley, D. T., O'Sullivan, E. P., Davenport, C., Devlin, N., Crowley, R. K., McCaffrey, N., ... O'Gorman, D. J. (2011). Similar to adiponectin, serum levels of osteoprotegerin are associated with obesity in healthy subjects. *Metabolism, 60*, 994–1000.

Ayina Ayina, C. N., Sobngwi, E., Essouma, M., Noubiap, J. J., Boudou, P., Etoundi Ngoa, L. S., & Gautier, J. F. (2015). Osteoprotegerin in relation to insulin resistance and blood lipids in sub-Saharan African women with and without abdominal obesity. *Diabetology and Metabolic Syndrome, 7*, 47.

Bach, L. A. (2015). Endothelial cells and the IGF system. *Journal of Molecular Endocrinology, 54*, R1–13.

Baron, R., & Kneissel, M. (2013). WNT signaling in bone homeostasis and disease: From human mutations to treatments. *Nature Medicine, 19*, 179–192.

Baud'huin, M., Duplomb, L., Teletchen, S., Lamoureux, F., Ruiz-Velasco, C., Maillasson, M., ... Heymann, D. (2013). Osteoprotegerin: Multiple partners for multiple functions. *Cytokine & Growth Factor Reviews, 24*, 401–409.

Bauer, E. M., Qin, Y., Miller, T. W., Bandle, R. W., Csanyi, G., Pagano, P. J., ... Isenberg, J. S. (2010). Thrombospondin-1 supports blood pressure by limiting eNOS activation and endothelial-dependent vasorelaxation. *Cardiovascular Research, 88*, 471–481.

Baum, M., Schiavi, S., Dwarakanath, V., & Quigley, R. (2005). Effect of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules. *Kidney International, 68*, 1148–1153.

Beaudoin, C., Jean, S., Bessette, L., Ste-Marie, L. G., Moore, L., & Brown, J. P. (2016). Denosumab compared to other treatments to prevent or treat osteoporosis in individuals at risk of fracture: A systematic review and meta-analysis. *Osteoporosis International, 27*, 2835–2844.

Benslimane-Ahmim, Z., Poirier, F., Delomenie, C., Lokajczyk, A., Grelac, F., Galy-Fauroux, I., ... Boisson-Vidal, C. (2013). Mechanistic study of the proangiogenic effect of osteoprotegerin. *Angiogenesis, 16*, 575–593.

Berezin, A. E., Kremzer, A. A., Martovitskaya, Y. V., Samura, T. A., Berezina, T. A., Zulli, A., ... Kruzliak, P. (2015). The utility of biomarker risk prediction score in patients with chronic heart failure. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 8*, 18255–18264.

Bernardi, S., Fabris, B., Thomas, M., Toffoli, B., Tikellis, C., Candido, R., ... Secchiero, P. (2014). Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. *Molecular and Cellular Endocrinology, 394*, 13–20.

Biomarkers Definitions Working, G (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics, 69*, 89–95.

Blair, J. M., Zhou, H., Seibel, M. J., & Dunstan, C. R. (2006). Mechanisms of disease: Roles of OPG, RANKL and RANK in the pathophysiology of skeletal metastasis. *Nature Clinical Practice. Oncology, 3*, 41–49.

Bolon, B., Campagnuolo, G., & Feige, U. (2002). Duration of bone protection by a single osteoprotegerin injection in rats with adjuvant-induced arthritis. *Cellular and Molecular Life Sciences, 59*, 1569–1576.

Boron, D., Kotrych, D., Bartkowiak-Wieczorek, J., Uzar, I., Bogacz, A., & Kaminski, A. (2015). Polymorphisms of OPG and their relation to the mineral density of bones in pre- and postmenopausal women. *International Immunopharmacology, 28*, 477–486.

Brandstrom, H., Stiger, F., Lind, L., Kahan, T., Melhus, H., & Kindmark, A. (2002). A single nucleotide polymorphism in the promoter region of the human gene for osteoprotegerin is related to vascular morphology and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 293*, 13–17.

Browner, W. S., Lui, L. Y., & Cummings, S. R. (2001). Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86*, 631–637.

Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., ... Simonet, W. S. (1998). Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & Development, 12*, 1260–1268.

Cao, J. J. (2011). Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 6*, 30.

Cao, H., Li, Q., Li, M., Od, R., Wu, Z., Zhou, Q., ... Wang, D. (2013). Osteoprotegerin/RANK/RANKL axis and atrial remodeling in mitral valvular patients with atrial fibrillation. *International Journal of Cardiology, 166*, 702–708.

Cao, H., Wang, J., Xi, L., Roe, O. D., Chen, Y., & Wang, D. (2011). Dysregulated atrial gene expression of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand axis in the development and progression of atrial fibrillation. *Circulation Journal, 75*, 2781–2788.

Charles, J. F., Ermann, J., & Aliprantis, A. O. (2015). The intestinal microbiome and skeletal fitness: Connecting bugs and bones. *Clinical Immunology, 159*, 163–169.

Chisalita, S. I., & Arnqvist, H. J. (2004). Insulin-like growth factor I receptors are more abundant than insulin receptors in human micro- and macrovascular endothelial cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 286*, E896–901.

Choi, N. K., Solomon, D. H., Tsacogianis, T. N., Landon, J. E., Song, H. J., & Kim, S. C. (2017). Comparative safety and effectiveness of denosumab versus zoledronic acid in patients with osteoporosis: A cohort study. *Journal of Bone and Mineral Research, 32*, 611–617.

Chung, C. P., Solus, J. F., Oeser, A., Li, C., Raggi, P., Smith, J. R., & Stein, C. M. (2015). A variant in the osteoprotegerin gene is associated with coronary atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis: Results from a candidate gene study. *International Journal of Molecular Sciences, 16*, 3885–3894.

Cianciolo, G., Capelli, I., Angelini, M. L., Valentini, C., Baraldi, O., Scolari, M. P., & Stefoni, S. (2014). Importance of vascular calcification in kidney transplant recipients. *American Journal of Nephrology, 39*, 418–426.

Condliffe, R., Pickworth, J. A., Hopkinson, K., Walker, S. J., Hameed, A. G., Suntharaligam, J., ... Lawrie, A. (2012). Serum osteoprotegerin is increased and predicts survival in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation, 2*, 21–27.

Corallini, F., Gonelli, A., D'Aurizio, F., di Iasio, M. G., & Vaccarezza, M. (2009). Mesenchymal stem cells-derived vascular smooth muscle cells release abundant levels of osteoprotegerin. *European Journal of Histochemistry, 53*, 19–24.

Cosman, F., Crittenden, D. B., Adachi, J. D., Binkley, N., Czerwinski, E., Ferrari, S., ... Grauer, A. (2016). Romosozumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England Journal of Medicine, 375*, 1532–1543.

Crisafulli, A., Micari, A., Altavilla, D., Saporito, F., Sardella, A., Passaniti, M., ... Squadrito, F. (2005). Serum levels of osteoprotegerin and RANKL in patients with ST elevation acute myocardial infarction. *Clinical Science (London, England), 109*, 389–395.

Cross, S. S., Yang, Z., Brown, N. J., Balasubramanian, S. P., Evans, C. A., Woodward, J. K., ... Holen, I. (2006). Osteoprotegerin (OPG)—A potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis? *International Journal of Cancer, 118*, 1901–1908.

Cummings, S. R., San Martin, J., McClung, M. R., Siris, E. S., Eastell, R., Reid, I. R., ... Trial, F. (2009). Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England Journal of Medicine, 361*, 756–765.

Cunha, D. A., Cito, M., Carlsson, P. O., Vanderwinden, J. M., Molkentin, J. D., Bugliani, M., ... Cnop, M. (2016). Thrombospondin 1 protects pancreatic beta-cells from lipotoxicity via the PERK-NRF2 pathway. *Cell Death and Differentiation, 23*, 1995–2006.

Davenport, C., Ashley, D. T., O'Sullivan, E. P., McHenry, C. M., Agha, A., Thompson, C. J., ... Smith, D. (2015). The effects of atorvastatin on arterial stiffness in male patients with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Research, 2015*, 846807.

Deftereos, S., Giannopoulos, G., Kossyvakis, C., Kaoukis, A., Raisakis, K., Panagopoulou, V., ... Cleman, M. W. (2012). Association of soluble tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand levels with coronary plaque burden and composition. *Heart, 98*, 214–218.

Demir, P., Erdenen, F., Aral, H., Emre, T., Kose, S., Altunoglu, E., ... Turkmen, A. (2016). Serum osteoprotegerin levels related with cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis, 30*, 811–817.

Di Bartolo, B. A., Schoppet, M., Mattar, M. Z., Rachner, T. D., Shanahan, C. M., & Kavurma, M. M. (2011). Calcium and osteoprotegerin regulate IGF1R expression to inhibit vascular calcification. *Cardiovascular Research, 91*, 537–545.

Daeshka, M. S., Lip, G. Y., Shezhitskiy, V., & Shantsila, E. (2015). Cardiac fibrosis in patients with atrial fibrillation: Mechanisms and clinical implications. *Journal of the American College of Cardiology, 66*, 943–959.

Ejtahed, H. S., Soroush, A. R., Angoorani, P., Larijani, B., & Hasani-Ranjbar, S. (2016). Gut microbiota as a target in the pathogenesis of metabolic disorders: A new approach to novel therapeutic agents. *Hormone and Metabolic Research, 48*, 349–358.

Estanislau, I. M., Terceiro, I. R., Lisboa, M. R., Teles Pde, B., Carvalho Rde, S., Martins, R. S., & Moreira, M. M. (2015). Pleiotropic effects of statins on the treatment of chronic periodontitis—A systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology, 79*, 877–885.

Forde, H., Harper, E., Davenport, C., Rochfort, K. D., Wallace, R., Murphy, R. P., ... Cummins, P. M. (2016). The beneficial pleiotropic effects of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) within the vasculature: A review of the evidence. *Atherosclerosis, 247*, 87–96.

Frey, R. S., Ushio-Fukai, M., & Malik, A. B. (2009). NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: Role in physiology and pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling, 11*, 791–810.

Frioes, F., Lasaczynska, O., Almeida, P. B., Silva, N., Guimaraes, J. T., Omland, T., ... Bettencourt, P. (2015). Prognostic value of osteoprotegerin in acute heart failure. *The*

Canadian Journal of Cardiology, 31, 1266–1271.
Fuernau, G., Zachringer, S., Eitel, I., de Waha, S., Droppa, M., Desch, S., ... Thiele, H. (2013). Osteoprotegerin in ST-elevation myocardial infarction: Prognostic impact and association with markers of myocardial damage by magnetic resonance imaging. *International Journal of Cardiology, 167*, 2134–2139.
Fulzele, K., & Clemens, T. L. (2012). Novel functions for insulin in bone. *Bone, 50*, 452–456.
Gannage-Yared, M. H., Yaghi, C., Habre, B., Khalife, S., Noun, R., Germanos-Haddad, M., & Trak-Smayra, V. (2008). Osteoprotegerin in relation to body weight, lipid parameters insulin sensitivity, adipocytokines, and C-reactive protein in obese and non-obese young individuals: Results from both cross-sectional and interventional study. *European Journal of Endocrinology, 158*, 353–359.
Genre, F., Lopez-Mejias, R., Garcia-Bermudez, M., Castaneda, S., Gonzalez-Juanatey, C., Llorca, J., ... Gonzalez-Gay, M. A. (2014). Osteoprotegerin CGA haplotype protection against cerebrovascular complications in anti-CCP negative patients with rheumatoid arthritis. *PloS One, 9*, e106823.
Giachelli, C. M., Bae, N., Almeida, M., Denhardt, D. T., Alpers, C. E., & Schwartz, S. M. (1993). Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation, 92*, 1686–1696.
di Giuseppe, R., Biemann, R., Wirth, J., Menzel, J., Isermann, B., Stangl, G. I., ... Weikert, C. (2017). Plasma osteoprotegerin, its correlates, and risk of heart failure: A prospective cohort study. *European Journal of Epidemiology, 32*, 113–123.
Gonzalez-Gay, M. A., Llorca, J., Palomino-Morales, R., Gomez-Acebo, I., Gonzalez-Juanatey, C., & Martin, J. (2009). Influence of nitric oxide synthase gene polymorphisms on the risk of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology, 27*, 116–119.
Guo, C., Hu, F., Zhang, S., Wang, Y., & Liu, H. (2013). Association between osteoprotegerin gene polymorphisms and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients. *Genetics and Molecular Biology, 36*, 177–182.
Hao, Y., Tsuruda, T., Sekita-Hatakeyama, Y., Kurogi, S., Kubo, K., Sakamoto, S., ... Kitamura, K. (2016). Cardiac hypertrophy is exacerbated in aged mice lacking the osteoprotegerin gene. *Cardiovascular Research, 110*, 62–72.
Harper, E., Forde, H., Davenport, C., Rochfort, K. D., Smith, D., & Cummins, P. M. (2016). Vascular calcification in type-2 diabetes and cardiovascular disease: Integrative roles for OPG, RANKL and TRAIL. *Vascular Pharmacology, 82*, 30–40.
Haxaire, C., Hay, E., & Geoffroy, V. (2016). Runx2 controls bone resorption through the down-regulation of the Wnt pathway in osteoblasts. *The American Journal of Pathology, 186*, 1598–1609.
Helas, S., Goettsch, C., Schoppet, M., Zeitz, U., Hempel, U., Morawietz, H., ... Hofbauer, L. C. (2009). Inhibition of receptor activator of NF-kappaB ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. *The American Journal of Pathology, 175*, 473–478.
Higashi, Y., Sukhanov, S., Anwar, A., Shai, S. Y., & Delafontaine, P. (2010). IGF-1, oxidative stress and atheroprotection. *Trends in Endocrinology and Metabolism, 21*, 245–254.
van't Hof, R. J., & Ralston, S. H. (2001). Nitric oxide and bone. *Immunology, 103*, 255–261.
Hofbauer, L. C., & Schoppet, M. (2002). Osteoprotegerin gene polymorphism and the risk of osteoporosis and vascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 87*, 4078–4079.
Holecki, M., Zahorska-Markiewicz, B., Janowska, J., Nieszporek, T., Wojaczynska-Stanek, K., Zak-Golab, A., & Wiecek, A. (2007). The influence of weight loss on serum osteoprotegerin concentration in obese perimenopausal women. *Obesity (Silver Spring), 15*, 1925–1929.
Iwai, K., Koike, M., Ohshima, S., Miyatake, K., Uchiyama, Y., Saeki, Y., & Ishii, M. (2007). RGS18 acts as a negative regulator of osteoclastogenesis by modulating the acid-sensing OGR1/NFAT signaling pathway. *Journal of Bone and Mineral Research, 22*, 1612–1620.
Jalife, J. (2014). Mechanisms of persistent atrial fibrillation. *Current Opinion in Cardiology, 29*, 20–27.
Johnson, R. C., Leopold, J. A., & Loscalzo, J. (2006). Vascular calcification: Pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circulation Research, 99*, 1044–1059.
Joiner, D. M., Ke, J., Zhong, Z., Xu, H. E., & Williams, B. O. (2013). LRP5 and LRP6 in development and disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism, 24*, 31–39.
Jono, S., Otsuki, S., Higashikuni, Y., Shioi, A., Mori, K., Hara, K., ... Ikari, Y. (2010). Serum osteoprotegerin levels and long-term prognosis in subjects with stable coronary artery disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis, 8*, 1170–1175.
Jono, S., Shioi, A., Ikari, Y., & Nishizawa, Y. (2006). Vascular calcification in chronic kidney disease. *Journal of Bone and Mineral Metabolism, 24*, 176–181.
Kanno, Y., Into, T., Lowenstein, C. J., & Matsushita, K. (2008). Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF-signalling. *Cardiovascular Research, 77*, 221–230.
Kiechl, S., Schett, G., Wenning, G., Redlich, K., Oberhollenzer, M., Mayr, A., ... Willeit, J. (2004). Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation, 109*, 2175–2180.
Kiechl, S., Werner, P., Knoflach, M., Furtner, M., Willeit, J., & Schett, G. (2006). The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: A bone key to vascular disease. *Expert Review of Cardiovascular Therapy, 4*, 801–811.
Kim, K. J., Kim, J. Y., Baek, I. W., Kim, W. U., & Cho, C. S. (2015). Elevated serum levels of syndecan-1 are associated with renal involvement in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology, 42*, 202–209.
Knudsen, S. T., Foss, C. H., Poulsen, P. L., Andersen, N. H., Mogensen, C. E., & Rasmussen, L. M. (2003). Increased plasma concentrations of osteoprotegerin in type 2 diabetic patients with microvascular complications. *European Journal of Endocrinology, 149*, 39–42.
Koole, D., Hurks, R., Schoneveld, A., Vink, A., Golledge, J., Moran, C. S., ... Moll, F. L. (2012). Osteoprotegerin is associated with aneurysm diameter and proteolysis in abdominal aortic aneurysm disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 32*, 1497–1504.
Kramer, I., Halleux, C., Keller, H., Pegurri, M., Gooi, J. H., Weber, P. B., ... Kneissel, M. (2010). Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Molecular and Cellular Biology, 30*, 3071–3085.
Kranenburg, G., Bartstra, J. W., Weijmans, M., de Jong, P. A., Mali, W. P., Verhaar, H. J., ... Spiering, W. (2016). Bisphosphonates for cardiovascular risk reduction: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis, 252*, 106–115.
Krishna, S. M., & Golledge, J. (2013). The role of thrombospondin-1 in cardiovascular health and pathology. *International Journal of Cardiology, 168*, 692–706.
Kubota, T., Michigami, T., & Ozono, K. (2009). Wnt signaling in bone metabolism. *Journal of Bone and Mineral Metabolism, 27*, 265–271.
Kuroda, Y., & Matsuo, K. (2012). Molecular mechanisms of triggering, amplifying and targeting RANK signaling in osteoclasts. *World Journal of Orthopedics, 3*, 167–174.
Kusumbe, A. P., Ramasamy, S. K., & Adams, R. H. (2014). Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature, 507*, 323–328.
Kuzniewski, M., Fedak, D., Dumnicka, P., Stepien, E., Kusnierz-Cabala, B., Cwynar, M., & Sulowicz, W. (2016). Osteoprotegerin and osteoprotegerin/TRAIL ratio are associated with cardiovascular dysfunction and mortality among patients with renal failure. *Advances in Medical Sciences, 61*, 269–275.
Labovsky, V., Vallone, V. B., Martinez, L. M., Otaegui, J., & Chasseing, N. A. (2012). Expression of osteoprotegerin, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, stromal cell-derived factor-1 and their receptors in epithelial metastatic breast cancer cell lines. *Cancer Cell International, 12*, 29.
Lacey, D. L., Boyle, W. J., Simonet, W. S., Kostenuik, P. J., Dougall, W. C., Sullivan, J. K., ... Dansey, R. (2012). Bench to bedside: Elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nature Reviews. Drug Discovery, 11*, 401–419.
Lawrie, A., Waterman, E., Southwood, M., Evans, D., Suntharalingam, J., Francis, S., ... Newman, C. (2008). Evidence of a role for osteoprotegerin in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The American Journal of Pathology, 172*, 256–264.
Lee, J., Packard, R. R., & Hsiai, T. K. (2015). Blood flow modulation of vascular dynamics. *Current Opinion in Lipidology, 26*, 376–383.
Lerman, D. A., Prasad, S., & Alotti, N. (2015). Calcific aortic valve disease: Molecular mechanisms and therapeutic approaches. *European Cardiology, 10*, 108–112.
Li, B., Lu, D., Chen, Y., Zhao, M., & Zuo, L. (2016). Unfractionated heparin promotes osteoclast formation in vitro by inhibiting osteoprotegerin activity. *International Journal of Molecular Sciences, 17*.
Li, V. S., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., ... Clevers, H. (2012). Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell, 149*, 1245–1256.
Li, M., Yang, S., & Xu, D. (2016). Heparan sulfate regulates the structure and function of osteoprotegerin in osteoclastogenesis. *Journal of Biological Chemistry, 291*, 24160–24171.
Lin, M. E., Chen, T. M., Wallingford, M. C., Nguyen, N. B., Yamada, S., Sawangmake, C., ... Giachelli, C. M. (2016). Runx2 deletion in smooth muscle cells inhibits vascular osteochondrogenesis and calcification but not atherosclerotic lesion formation. *Cardiovascular Research, 12*(2), 606–616.
Lopez-Mejias, R., Castaneda, S., Gonzalez-Juanatey, C., Corrales, A., Ferraz-Amaro, I., Genre, F., ... Gonzalez-Gay, M. A. (2016). Cardiovascular risk assessment in patients with rheumatoid arthritis: The relevance of clinical, genetic and serological markers. *Autoimmunity Reviews, 15*, 1013–1030.
Lopez-Mejias, R., Ubilla, B., Genre, F., Corrales, A., Hernandez, J. L., Ferraz-Amaro, I., ... Dessein, P. H. (2015). Osteoprotegerin concentrations relate independently to established cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology, 42*, 39–45.
Luo, J., Yang, Z., Ma, Y., Yue, Z., Lin, H., Qu, G., ... Liu, M. (2016). LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nature Medicine, 22*, 539–546.
Maes, C., Goossens, S., Bartunkova, S., Drogat, B., Coenegrachts, L., Stockmans, I., ... Haigh, J. J. (2010). Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones. *The EMBO Journal, 29*, 424–441.
Mangan, S. H., Van Campenhout, A., Rush, C., & Golledge, J. (2007). Osteoprotegerin upregulates endothelial cell adhesion molecule response to tumor necrosis factor-alpha associated with induction of angiopoietin-2. *Cardiovascular Research, 76*, 494–505.
Manolagas, S. C., O'Brien, C. A., & Almeida, M. (2013). The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nature Reviews. Endocrinology, 9*, 699–712.
McGonigle, J. S., Giachelli, C. M., & Scatena, M. (2009). Osteoprotegerin and RANKL differentially regulate angiogenesis and endothelial cell function. *Angiogenesis, 12*, 35–46.
Meluzin, J., & Tomandl, J. (2015). Can biomarkers help to diagnose early heart failure with preserved ejection fraction? *Disease Markers, 2015*, 426045.
Mencke, R., Hillebrands, J. L., & consortium, N (2017). The role of the anti-ageing protein Klotho in vascular physiology and pathophysiology. *Ageing Research Reviews, 35*, 124–146.
Messalli, E. M., Mainini, G., Scaffa, C., Caffero, A., Salzillo, P. L., Raguci, A., & Cobellis, L. (2007). Raloxifene therapy interacts with serum osteoprotegerin in postmenopausal women. *Maturitas, 56*, 38–44.
Menquita-Rayn, P., de la Higuera, M., Garcia, D. F., Alonso, G., Ruiz-Requena, M. E., de Dios Luna, J., ... Munoz-Torres, M. (2005). The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporosis*

International, *16*, 1368–1374.
Mimura, J., & Itoh, K. (2015). Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, *88*, 221–232.
Min, H., Morony, S., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Capparelli, C., Scully, S., ... Simonet, W. S. (2000). Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*, 463–474.
Moester, M. J., Papapoulos, S. E., Lowik, C. W., & van Bezooijen, R. L. (2010). Sclerostin: Current knowledge and future perspectives. *Calcified Tissue International*, *87*, 99–107.
Mogelvang, R., Haahr-Pedersen, S., Bjerre, M., Frystyk, J., Iversen, A., Galatius, S., ... Jensen, J. S. (2013). Osteoprotegerin improves risk detection by traditional cardiovascular risk factors and hsCRP. *Heart*, *99*, 106–110.
Montagnana, M., Lippi, G., Danese, E., & Guidi, G. C. (2013). The role of osteoprotegerin in cardiovascular disease. *Annals of Medicine*, *45*, 254–264.
Montecucco, F., Steffens, S., & Mach, F. (2007). The immune response is involved in atherosclerotic plaque calcification: Could the RANKL/RANK/OPG system be a marker of plaque instability? *Clinical & Developmental Immunology*, *2007*, 75805.
Moran, C. S., McCann, M., Karan, M., Norman, P., Ketheesan, N., & Golledge, J. (2005). Association of osteoprotegerin with human abdominal aortic aneurysm progression. *Circulation*, *111*, 3119–3125.
Morinaga, T., Nakagawa, N., Yasuda, H., Tsuda, E., & Higashio, K. (1998). Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *European Journal of Biochemistry*, *254*, 685–691.
Morisawa, T., Nakagomi, A., Kohashi, K., Kosugi, M., Kusama, Y., Atarashi, H., & Shimizu, W. (2015). Osteoprotegerin is associated with endothelial function and predicts early carotid atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *International Heart Journal*, *56*, 605–612.
Morony, S., Tintut, Y., Zhang, Z., Cattley, R. C., Van, G., Dwyer, D., ... Demer, L. L. (2008). Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in ldlr(−/−) mice. *Circulation*, *117*, 411–420.
Mosheimer, B. A., Kaneider, N. C., Feistritzer, C., Djanani, A. M., Sturn, D. H., Patsch, J. R., & Wiedermann, C. J. (2005). Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *90*, 2964–2971.
Nagy, E. E., Varga-Fekete, T., Puskas, A., Kelemen, P., Brassai, Z., Szekeres-Csiki, K., ... Harsfalvi, J. (2016). High circulating osteoprotegerin levels are associated with non-zero blood groups. *BMC Cardiovascular Disorders*, *16*, 106.
Nakahara, T., Dweck, M. R., Narula, N., Pisapia, D., Narula, J., & Strauss, H. W. (2017). Coronary artery calcification: From mechanism to molecular imaging. *JACC Cardiovascular Imaging*, *10*, 582–593.
Nakahara, T., Kawai-Kowase, K., Matsui, H., Sunaga, H., Utsugi, T., Iso, T., ... Kurabayashi, M. (2016). Fibroblast growth factor 23 inhibits osteoblastic gene expression and induces osteoprotegerin in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, *253*, 102–110.
Naot, D., Choi, A., Musson, D. S., Simsek Kiper, P. O., Utine, G. E., Boduroglu, K., ... Cundy, T. (2014). Novel homozygous mutations in the osteoprotegerin gene TNFRSF11B in two unrelated patients with juvenile Paget's disease. *Bone*, *68*, 6–10.
Neville-Webbe, H. L., Cross, N. A., Eaton, C. L., Nyambo, R., Evans, C. A., Coleman, R. E., & Holen, I. (2004). Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *Breast Cancer Research and Treatment*, *86*, 269–279.
Nicoll, R., Zhao, Y., Ibrahimi, P., Olivercrona, G., & Henein, M. (2016). Diabetes and hypertension consistently predict the presence and extent of coronary artery calcification in symptomatic patients: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*.
Niessner, A., Hohensinner, P. J., Rychli, K., Neuhold, S., Zorn, G., Richter, B., ... Pacher, R. (2009). Prognostic value of apoptosis markers in advanced heart failure patients. *European Heart Journal*, *30*, 789–796.
Nybo, M., & Rasmussen, L. M. (2008). Osteoprotegerin released from the vascular wall by heparin mainly derives from vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, *201*, 33–35.
Oh, E. S., Rhee, E. J., Oh, K. W., Lee, W. Y., Baek, K. H., Yoon, K. H., ... Park, S. W. (2005). Circulating osteoprotegerin levels are associated with age, waist-to-hip ratio, serum total cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy Korean women. *Metabolism*, *54*, 49–54.
Omland, T., Ueland, T., Jansson, A. M., Persson, A., Karlsson, T., Smith, C., ... Caidahl, K. (2008). Circulating osteoprotegerin levels and long-term prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*, *51*, 627–633.
Orita, Y., Yamamoto, H., Kohno, N., Sugihara, M., Honda, H., Kawamata, S., ... Yoshizumi, M. (2007). Role of osteoprotegerin in arterial calcification: Development of new animal model. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*, 2058–2064.
Osako, M. K., Nakagami, H., Koibuchi, N., Shimizu, H., Nakagami, F., Koriyama, H., ... Morishita, R. (2010). Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: Common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circulation Research*, *107*, 466–475.
Oudot, A., Martin, C., Busseuil, D., Vergely, C., Demaison, L., & Rochette, L. (2006). NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. *Free Radical Biology & Medicine*, *40*, 2214–2222.
Pan, Y., Liang, H., Liu, H., Li, D., Chen, X., Li, L., ... Zen, K. (2014). Platelet-secreted microRNA-223 promotes endothelial cell apoptosis induced by advanced glycation end products via targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *Journal of Immunology*, *192*, 437–446.
Panizo, S., Cardus, A., Encinas, M., Parisi, E., Valcheva, P., Lopez-Ongil, S., ... Valdivielso, J. M. (2009). RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circulation Research*, *104*, 1041–1048.
Perez de Ciriza, C., Lawrie, A., & Varo, N. (2015). Osteoprotegerin in cardiometabolic disorders. *International Journal of Endocrinology*, *2015*, 564934.
Perez de Ciriza, C., Moreno, M., Restituto, P., Bastarrika, G., Simon, I., Colina, I., & Varo, N. (2014). Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification. *Clinical Biochemistry*, *47*, 272–278.
Pessy, V., & D'Haese, P. (2009). Vascular calcification and bone disease: The calcification paradox. *Trends in Molecular Medicine*, *15*, 405–416.
Pietschmann, P., Mechtcheriakova, D., Meshcheryakova, A., Foger-Samwald, U., & Ellinger, I. (2016). Immunology of osteoporosis: A mini-review. *Gerontology*, *62*, 128–137.
Pimanda, J. E., Annis, D. S., Raftery, M., Mosher, D. F., Chesterman, C. N., & Hogg, P. J. (2002). The von Willebrand factor-reducing activity of thrombospondin-1 is located in the calcium-binding/C-terminal sequence and requires a free thiol at position 974. *Blood*, *100*, 2832–2838.
Pober, J. S., & Tellides, G. (2012). Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends in Immunology*, *33*, 49–57.
Pritzker, L. B., Scatena, M., & Giachelli, C. M. (2004). The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Molecular Biology of the Cell*, *15*, 2834–2841.
Quercioli, A., Mach, F., Bertolotto, M., Langlet, S., Vuilleumier, N., Galan, K., ... Montecucco, F. (2012). Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) increases the release of neutrophil products associated with coronary vulnerability. *Thrombosis and Haemostasis*, *107*, 124–139.
Ramasamy, S. K., Kusumbe, A. P., Wang, L., & Adams, R. H. (2014). Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature*, *507*, 376–380.
Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, *200*, 373–383.
Rasmussen, L. M., & Ledet, T. (2005). Osteoprotegerin and diabetic macroangiopathy. *Hormone and Metabolic Research*, *37*(Suppl. 1), 90–94.
Rasmussen, L. M., Tarnow, L., Hansen, T. K., Parving, H. H., & Flyvbjerg, A. (2006). Plasma osteoprotegerin levels are associated with glycaemic status, systolic blood pressure, kidney function and cardiovascular morbidity in type 1 diabetic patients. *European Journal of Endocrinology*, *154*, 75–81.
Rattazzi, M., Faggin, E., Buso, R., Di Virgilio, R., Puato, M., Plebani, M., ... Pauletto, P. (2016). Atorvastatin reduces circulating osteoprogenitor cells and T-cell RANKL expression in osteoporotic women: Implications for the bone-vascular axis. *Cardiovascular Therapeutics*, *34*, 13–20.
Reinhard, H., Lajer, M., Gall, M. A., Tarnow, L., Parving, H. H., Rasmussen, L. M., & Rossing, P. (2010). Osteoprotegerin and mortality in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, *33*, 2561–2566.
Rewiuk, K., & Grodzicki, T. (2015). Osteoprotegerin and TRAIL in acute onset of atrial fibrillation. *BioMed Research International*, *2015*, 259843.
Riegel, A., Maurer, T., Prior, B., Stegmaier, S., Heppert, V., Wagner, C., & Hansch, G. M. (2012). Human polymorphonuclear neutrophils express RANK and are activated by its ligand, RANKL. *European Journal of Immunology*, *42*, 975–981.
Rochette, L., Lorin, J., Zeller, M., Guilland, J. C., Lorgis, L., Cottin, Y., & Vergely, C. (2013). Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacology & Therapeutics*, *140*, 239–257.
Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2014). Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1840*, 2709–2729.
Roth, G. A., Huffman, M. D., Moran, A. E., Feigin, V., Mensah, G. A., Naghavi, M., & Murray, C. J. (2015). Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. *Circulation*, *132*, 1667–1678.
Ricci, N., Capulli, M., Piperni, S. G., Cappariello, A., Lau, P., Frings-Meuthen, P., ... Teti, A. (2015). Lipocalin 2: A new mechanoresponding gene regulating bone homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research*, *30*, 357–368.
Sage, A. P., Tintut, Y., & Demer, L. L. (2010). Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nature Reviews. Cardiology*, *7*, 528–536.
Sandberg, W. J., Yndestad, A., Oie, E., Smith, C., Ueland, T., Ovchinnikova, O., ... Aukrust, P. (2006). Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: Possible role in plaque destabilization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*, 857–863.
Schnabel, R. B., Larson, M. G., Yamamoto, J. F., Kathiresan, S., Rong, J., Levy, D., ... Benjamin, E. J. (2009). Relation of multiple inflammatory biomarkers to incident atrial fibrillation. *The American Journal of Cardiology*, *104*, 92–96.
Schneewels, L. A., Willard, D., & Milla, M. E. (2005). Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *Journal of Biological Chemistry*, *280*, 41155–41164.
Schoppet, M., Al-Fakhri, N., Franke, F. E., Katz, N., Barth, P. J., Maisch, B., ... Hofbauer, L. C. (2004). Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*, 4104–4112.
Schoppet, M., Henser, S., Ruppert, V., Stubig, T., Al-Fakhri, N., Maisch, B., & Hofbauer, L. C. (2007). Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF-kappaB-dependent. *Journal of Cellular Biochemistry*, *100*, 1430–1439.
Schoppet, M., Sattler, A. M., Schaefer, J. R., Herzum, M., Maisch, B., & Hofbauer, L. C. (2003). Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *88*, 1024–1028.
Schurgers, L. J., Cranenburg, E. C., & Vermeer, C. (2008). Matrix Gla-protein: The calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thrombosis and Haemostasis*, *100*, 593–603.
Schweighofer, N., Algeisreiter, A., Trummer, O., Graf-Rechberger, M., Hacker, N., Knlepeiss, D., ... Muller, H. (2016). Direct comparison of regulators of calcification between bone and vessels in humans. *Bone*, *88*, 31–38.
Secchiero, P., Corallini, F., Rimondi, E., Chiarutti, C., di Iasio, M. G., Rustighi, A., ...

Zauli, G. (2008). Activation of the p53 pathway down-regulates the osteoprotegerin expression and release by vascular endothelial cells. *Blood, 111*, 1287–1294.
Shanahan, C. M. (2013). Mechanisms of vascular calcification in CKD-evidence for premature ageing? *Nature Reviews. Nephrology, 9*, 661–670.
Shetelig, C., Limalanathan, S., Eritsland, J., Hoffmann, P., Seljeflot, I., Gran, J. M., ... Andersen, G. O. (2017). Osteoprotegerin levels in ST-elevation myocardial infarction: Temporal profile and association with myocardial injury and left ventricular function. *PloS One, 12*, e0173034.
Shi, G. X., Mao, W. W., Zheng, X. F., & Jiang, L. S. (2016). The role of R-spondins and their receptors in bone metabolism. *Progress in Biophysics and Molecular Biology, 122*, 93–100.
Shioi, A., Katagi, M., Okuno, Y., Mori, K., Jono, S., Koyama, H., & Nishizawa, Y. (2002). Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: Roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circulation Research, 91*, 9–16.
Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., ... Boyle, W. J. (1997). Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell, 89*, 309–319.
Sims, N. A., & Martin, T. J. (2014). Coupling the activities of bone formation and resorption: A multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Reports, 3*, 481.
Sims, N. A., & Martin, T. J. (2015). Coupling signals between the osteoclast and osteoblast: How are messages transmitted between these temporary visitors to the bone surface? *Frontiers in Endocrinology (Lausanne), 6*, 41.
Singh, S., Grabner, A., Yanucil, C., Schramm, K., Czaya, B., Krick, S., ... Faul, C. (2016). Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease. *Kidney International, 90*, 985–996.
Songia, P., Branchetti, E., Parolari, A., Myasoedova, V., Ferrari, G., Alamanni, F., ... Poggio, P. (2016). Mitral valve endothelial cells secrete osteoprotegerin during endothelial mesenchymal transition. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology, 98*, 48–57.
Souffi, M., Schoppet, M., Sattler, A. M., Herzum, M., Maisch, B., Hofbauer, L. C., & Schaefer, J. R. (2004). Osteoprotegerin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 89*, 3764–3768.
Soysal-Atile, N., Guldiken, S., Sipahi, T., Yukcu, F., Ekiz-Bilir, B., Huseyin, S., & Tugrul, A. (2015). Relationship between an osteoprotegerin gene polymorphism and diabetic vascular complications. *Clinical Laboratory, 61*, 595–601.
Tang, P., Xiong, Q., Ge, W., & Zhang, L. (2014). The role of microRNAs in osteoclasts and osteoporosis. *RNA Biology, 11*, 1355–1363.
Tarantino, U., Celi, M., Feola, M., Liuni, F. M., Resmini, G., & Iolascon, G. (2013). A new antiresorptive approach to the treatment of fragility fractures: Long-term efficacy and safety of denosumab. *Aging Clinical and Experimental Research, 25*(Suppl. 1), S65–69.
Tella, S. H., & Gallagher, J. C. (2014). Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 142*, 155–170.
Terekeci, H. M., Senol, M. G., Top, C., Sahan, B., Celik, S., Sayan, O., ... Ozata, M. (2009). Plasma osteoprotegerin concentrations in type 2 diabetic patients and its association with neuropathy. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 117*, 119–123.
Theoleyre, S., Kwan Tat, S., Vusio, P., Blanchard, F., Gallagher, J., Ricard-Blum, S., ... Heymann, D. (2006). Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: Role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 347*, 460–467.
Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S. K., Fortun, Y., Redini, F., & Heymann, D. (2004). The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine & Growth Factor Reviews, 15*, 457–475.
Toffoli, B., Bernardi, S., Candido, R., Zacchigna, S., Fabris, B., & Secchiero, P. (2012). TRAIL shows potential cardioprotective activity. *Investigational New Drugs, 30*, 1257–1260.
Toffoli, B., Pickering, R. J., Tsorotes, D., Wang, B., Bernardi, S., Kantharidis, P., ... Thomas, M. C. (2011). Osteoprotegerin promotes vascular fibrosis via a TGF-beta1 autocrine loop. *Atherosclerosis, 218*, 61–68.
Tomlinson, R. E., & Silva, M. J. (2013). Skeletal blood flow in bone repair and maintenance. *Bone Research, 1*, 311–322.
Troncoso, R., Ibarra, C., Vicencio, J. M., Jaimovich, E., & Lavandero, S. (2014). New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends in Endocrinology and Metabolism, 25*, 128–137.
Tsioufis, C., Aggelis, A., Dimitriadis, K., Thomopoulos, C., Kasiakogias, A., Tzamou, V., ... Stefanadis, C. (2011). Relationships of osteoprotegerin with albuminuria and asymmetric dimethylarginine in essential hypertension: Integrating vascular dysfunction. *Expert Opinion on Therapeutic Targets, 15*, 1347–1353.
Ueland, T., Yndestad, A., Oie, E., Florholmen, G., Halvorsen, B., Froland, S. S., ... Aukrust, P. (2005). Dysregulated osteoprotegerin/RANK ligand/RANK axis in clinical and experimental heart failure. *Circulation, 111*, 2461–2468.
Uemura, H., Yasui, T., Miyatani, Y., Yamada, M., Hiyoshi, M., Arisawa, K., & Irahara, M. (2008). Circulating osteoprotegerin is associated with age and systolic blood pressure, but not with lipid profile or fasting glucose, in postmenopausal women. *Menopause, 15*, 180–184.
Ugur-Altun, B., Altun, A., Gerenli, M., & Tugrul, A. (2005). The relationship between insulin resistance assessed by HOMA-IR and serum osteoprotegerin levels in obesity. *Diabetes Research and Clinical Practice, 68*, 217–222.
Van Campenhout, A., & Golledge, J. (2009). Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis, 204*, 321–329.
Vassalle, C., & Mazzone, A. (2016). Bone loss and vascular calcification: A bi-directional interplay? *Vascular Pharmacology, 86*, 77–86.
Veeriah, V., Zanniti, A., Paone, R., Chatterjee, S., Rucci, N., Teti, A., & Capulli, M. (2016). Interleukin-1beta, lipocalin 2 and nitric oxide synthase 2 are mechano-responsive mediators of mouse and human endothelial cell-osteoblast crosstalk. *Scientific Reports, 6*, 29880.
Venuraju, S. M., Yerramasu, A., Corder, R., & Lahiri, A. (2010). Osteoprotegerin as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular mortality and morbidity. *Journal of the American College of Cardiology, 55*, 2049–2061.
Vidal, C., Fonseca, R., & Xuereb-Anastasi, A. (2011). Functional polymorphisms within the TNFRSF11B (osteoprotegerin) gene increase the risk for low bone mineral density. *Journal of Molecular Endocrinology, 47*, 327–333.
Viereck, V., Grundker, C., Blaschke, S., Frosch, K. H., Schoppet, M., Emons, G., & Hofbauer, L. C. (2005). Atorvastatin stimulates the production of osteoprotegerin by human osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry, 96*, 1244–1253.
Walsh, M. C., & Choi, Y. (2014). Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond. *Frontiers in Immunology, 5*, 511.
Wang, Y., Nishida, S., Elalieh, H. Z., Long, R. K., Halloran, B. P., & Bikle, D. D. (2006). Role of IGF-I signaling in regulating osteoclastogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research, 21*, 1350–1358.
Weiss, R. M., Lund, D. D., Chu, Y., Brooks, R. M., Zimmerman, K. A., El Accaoui, R., ... Heistad, D. D. (2013). Osteoprotegerin inhibits aortic valve calcification and preserves valve function in hypercholesterolemic mice. *PloS One, 8*, e65201.
Weitzmann, M. N., & Ofotokun, I. (2016). Physiological and pathophysiological bone turnover—Role of the immune system. *Nature Reviews. Endocrinology, 12*, 518–532.
Wilson, M. E., & Westberry, J. M. (2009). Regulation of oestrogen receptor gene expression: New insights and novel mechanisms. *Journal of Neuroendocrinology, 21*, 238–242.
Wright, H. L., McCarthy, H. S., Middleton, J., & Marshall, M. J. (2009). RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine, 2*, 56–64.
Writing Group, M., Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., ... Stroke Statistics, S. (2016). Executive summary: Heart disease and stroke statistics—2016 update: A report from the American Heart Association. *Circulation, 133*, 447–454.
Wu, G., Li, H., Zhou, M., Fang, Q., Bao, Y., Xu, A., & Jia, W. (2014). Mechanism and clinical evidence of lipocalin-2 and adipocyte fatty acid-binding protein linking obesity and atherosclerosis. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 30*, 447–456.
Xie, P. (2013). TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *Journal of Molecular Signalling, 8*, 7.
Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Goto, M., Kobayashi, F., Tsuda, E., Morinaga, T., & Higashio, K. (1998). Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *Journal of Biological Chemistry, 273*, 5117–5123.
Yan, J., Herzog, J. W., Tsang, K., Brennan, C. A., Bower, M. A., Garrett, W. S., ... Charles, J. F. (2016). Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113*, E7554–E7563.
Yao, Y., Wang, G., Wang, Z., Wang, C., Zhang, H., & Liu, C. (2011). Synergistic enhancement of new bone formation by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and osteoprotegerin in trans-sutural distraction osteogenesis: A pilot study in dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 69*, e446–455.
Zannettino, A. C., Holding, C. A., Diamond, P., Atkins, G. J., Kostakis, P., Farrugia, A., ... Haynes, D. R. (2005). Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *Journal of Cellular Physiology, 204*, 714–723.
Zauli, G., Corallini, F., Bossi, F., Fischetti, F., Durigutto, P., Celeghini, C., ... Secchiero, P. (2007). Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood, 110*, 536–543.
Zhang, H., Feng, L., Wan, Q., Hong, Y., Li, Y., Cheng, G., & Han, X. (2015). Osteoprotegerin is associated with depletion of circulating endothelial progenitor cells and elevation in pulmonary arterial pressure in patients with systolic heart failure. *Acta Cardiologica, 70*, 435–441.
Zhao, H. Y., Liu, J. M., Ning, G., Zhao, Y. J., Zhang, L. Z., Sun, L. H., ... Chen, J. L. (2005). The influence of Lys3Asn polymorphism in the osteoprotegerin gene on bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Osteoporosis International, 16*, 1519–1524.
Ziegler, S., Kudlacek, S., Luger, A., & Minar, E. (2005). Osteoprotegerin plasma concentrations correlate with severity of peripheral artery disease. *Atherosclerosis, 182*, 175–180.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Review

Regenerative Capacity of Endogenous Factor: Growth Differentiation Factor 11; a New Approach of the Management of Age-Related Cardiovascular Events

Luc Rochette [1,*], Alexandre Meloux [1], Eve Rigal [1], Marianne Zeller [1], Yves Cottin [1,2], Gabriel Malka [3] and Catherine Vergely [1]

[1] Equipe d'Accueil (EA 7460): Physiopathologie et Epidémiologie Cérébro-Cardiovasculaires (PEC2), Université de Bourgogne – Franche Comté, Faculté des Sciences de Santé, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France; alexandre.meloux@gmail.com (A.M.); eve.rigal@u-bourgogne.fr (E.R.); marianne.zeller@u-bourgogne.fr (M.Z.); yves.cottin@chu-dijon.fr (Y.C.); catherine.vergely@u-bourgogne.fr (C.V.)

[2] Service de Cardiologie—CHU-Dijon, 21 000 Dijon, France

[3] Institut de formation en biotechnologie et ingénierie biomédicale (IFR2B), Université Mohammed VI Polytechnique, 43 150 Ben-Guerir, Morocco; catherine.vergely@u-bourgogne.fr

* Correspondence: luc.rochette@u-bourgogne.fr; Tel.: +33(0)-380-393-291.

Received: 16 November 2018; Accepted: 5 December 2018; Published: 12 December 2018

check for updates

Abstract: Aging is a complicated pathophysiological process accompanied by a wide array of biological adaptations. The physiological deterioration correlates with the reduced regenerative capacity of tissues. The rejuvenation of tissue regeneration in aging organisms has also been observed after heterochronic parabiosis. With this model, it has been shown that exposure to young blood can rejuvenate the regenerative capacity of peripheral tissues and brain in aged animals. An endogenous compound called growth differentiation factor 11 (GDF11) is a circulating negative regulator of cardiac hypertrophy, suggesting that raising GDF11 levels could potentially treat or prevent cardiac diseases. The protein GDF11 is found in humans as well as animals. The existence of endogenous regulators of regenerative capacity, such as GDF11, in peripheral tissues and brain has now been demonstrated. It will be important to investigate the mechanisms with therapeutic promise that induce the regenerative effects of GDF11 for a variety of age-related diseases.

Keywords: GDF11; regenerative; parabiosis; cardiovascular events; ageing

1. Introduction

The prevalence of a number of chronic diseases is much higher in the elderly. These diseases include cardiovascular diseases, stroke, cancer, and dementia. There are strong similarities between the cellular changes related to aging and those found in some of the most common chronic, non-communicable, and mostly multifactorial diseases. Several major theories have been put forward to explain the biology of aging, and these are not mutually exclusive. It is now well established that cellular senescence is associated with the activation of pro-inflammatory pathways and free radical production [1]. Novel ways to diagnose aging involving telomeres and other markers of senescence are being validated. Biological factors appear as "mediators," which can be targeted to slow down or even reverse disease or physiological conditions such as aging [2]. It is widely accepted that the rate of aging reflects the ratio of tissue attrition to tissue regeneration; it thus seems credible to assume that accelerated aging can result from an alteration of this balance, caused by either the exacerbation of tissue attrition or a defect in tissue regeneration. The human heart is a highly dynamic organ that retains a significant degree of plasticity throughout life and even in the presence of heart

failure. The reversibility of certain aspects of aging has become increasingly appreciated. The stem cell compartment appears to be properly equipped to regulate tissue homeostasis, but this function is determined by the plasticity and heterogeneity of adult stem cells [3–5].

2. Mechanistic and Evolutionary Bases of Aging

Aging is characterized by a regular functional drop of all organs. It is endogenous, progressive, and deleterious for the individual. Among all aging theories, one describes nitro-oxidative stress associated with the overproduction of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). It implies that progressive aging is associated with metabolic diseases [6,7].

Vascular aging is the major contributing factor to increases in the incidence and prevalence of cardiovascular disease, due mainly to the presence of chronic, low-grade inflammation. Aging produces its own cardiovascular changes, mainly remodeling of arteries and the myocardium [8]. Cardiovascular diseases (CVD), including hypertension, coronary artery disease (CAD), atrial fibrillation and chronic heart failure (CHF), are highly prevalent in the elderly. CHF associated with hypertrophy is a mounting health problem that affects up to 10% of people over the age of 65 and it is associated with frequent hospital admissions, reduced quality of life, significant morbidity, and increased mortality. Cardiac hypertrophy is considered an initially adaptive response that counteracts increased wall tension and helps maintain cardiac output. However, if the heart is persistently exposed to increased loads, cardiac hypertrophy may become maladaptive, leading to heart failure. Aging is associated with an extensive loss of function at all levels of biological organization. Studies using model organisms have generated significant insights into the genetic factors and environmental conditions that influence the age-related decline [9,10]. Progressive aging induces several structural and functional alterations in the cardiovascular system, among which a reduced number of myocardial cells and increased interstitial collagen fibers are particularly important as they result in the development of heart failure. The signals and mechanisms that cause age-related tissue failure are unclear. One of these alterations is a change in the activity of the protein kinase Akt, which plays a central role in regulating a variety of cellular processes ranging from cell survival to aging. Extensive studies have established that growth factors, hormones, and cytokines stimulate Akt activation through serial phosphorylation events. Accumulating evidence illustrates that different Akt isoforms are responsible for their diverse biological functions.

In cardiac hypertrophy and aging, sirtuins (SIRT) have been shown to regulate Akt signaling. The SIRT isoforms SIRT 1, SIRT3, and SIRT6 play a central role in the regulation of Akt activation. Although SIRT1 deacetylates Akt to promote phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate binding and activation, SIRT3 controls ROS-mediated Akt activation, and SIRT6 transcriptionally represses Akt at the level of chromatin [11]. In the cardiovascular field, treatments can protect heart muscle tissue after acute myocardial infarction (MI). Post-infarction remodeling and the evolution to CHF remain a problem in the treatment of cardiovascular disorders. Tissue regeneration is characterized by composite drops of growth factors with decisive roles in cell proliferation and differentiation. [12]. Numerous trials have been started to explore the transplantation of stem-cell populations for cardiac regeneration. Although most cell types produced hopeful results in vitro and in preclinical studies, they were disappointing in terms of clinical profits [13,14].

Growth differentiation factor 11 (GDF11) belongs to the transforming growth factor β: TGF-β family. Members of the TGF-β superfamily are highly conserved across animals. They are ubiquitously expressed in diverse tissues and function during the earliest stages of development and throughout life. The TGF-β superfamily of secreted factors comprises more than 30 members including activins, nodals, bone morphogenetic proteins (BMPs), and the GDFs such as GDF11 and GDF15. TGF-β family members are involved in a wide range of functions and play key roles in embryogenesis, development, and tissue homeostasis.

GDF11, like other members of the TGF-β superfamily, are generated from precursor proteins by proteolytic processing [15]. After cleavage of a single peptide bond by a furin-type protease,

the N-terminal propeptide and the disulfide-bonded homodimer containing the mature growth factor domains remain connected, establishing an inactive and latent complex. The active mature growth factors may be released from the latent complexes beyond degradation of the propeptide via proteases [16] (Figure 1). GDF11 is a disulfide-linked dimer. It is firstly synthesized as precursor and next cleaved by furin-like proteases separating the N-terminal prodomain from the C-terminal domain.

GDF11 is expressed in the pancreas, intestine, kidney, skeletal muscle, heart, developing nervous system, olfactory system, and retina [17]. Its expression is present in young adult organs and decline during aging. In return, a study [18] demonstrated that GDF11 serum levels do not reduce during aging. The reagents used in some studies were not GDF11-specific, interfering with myostatin evaluation. The amino acid sequence of GDF11 is 90% identical to that of myostatin [19]. Recently, based on quantification by Western blot analysis, a study showed that circulating GDF11/8 levels decreased with age in mice as well as in other mammalian species, and that increasing GDF11/8 levels with exogenous GDF11 regulated cardiomyocyte size [20].

Clearly, the search for humoral factors, such as GDF11, able to affect regenerative capacity, should be re-examined [21]. Different functions of GDF11 in controlling progenitor proliferation and/or differentiation were demonstrated [22]. Experimental methods using techniques of parabiosis demonstrate that impaired regeneration in aged mice is reversible by exposure to circulation of young animals. GDF11 controls heart and muscle aging, suggesting that young blood contains "rejuvenating" factors that can renovate regenerative process.

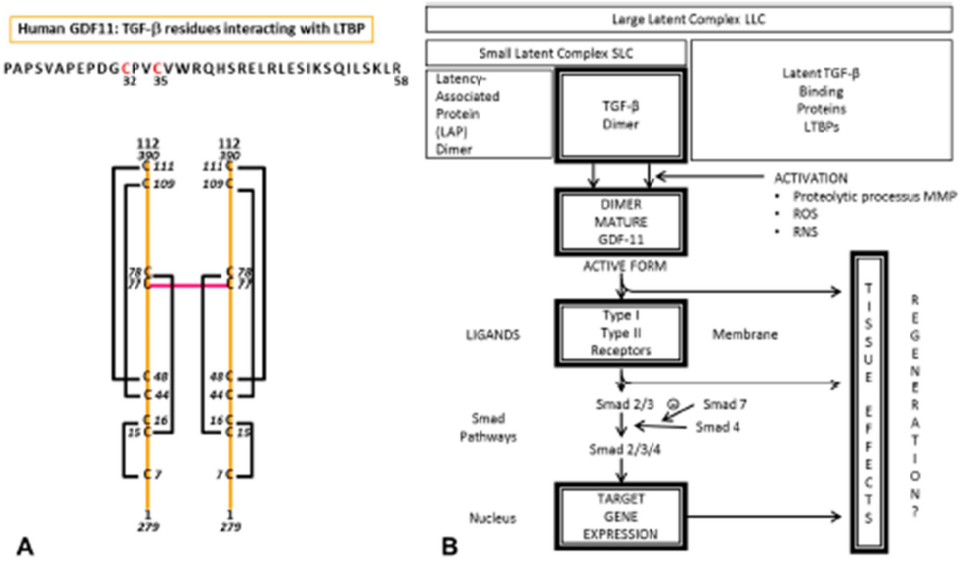


Figure 1. Structural organization of GDF11 mature domain (**A**) and schematic representation of GDF11 signaling pathways (**B**). (**A**) Mature GDF11 exists as a disulfide-linked homodimer with apparent molecular weights of 25 kDa. The active domain of GDF11 is typically found as a dimer, linked by cysteine-bonds. The symmetrical dimer forms two distinct interfaces for receptor binding. All the other cysteine C are involved in intrachain disulfide bonds. As show in the schematic representation, there are four disulfide bounds in each homodimer. C plays an important role in stabilization of protein structure. The LTBPs (latent transforming growth factor β binding proteins) are components of the extracellular matrix, identified as forming latent complexes with TGF-β. (**B**) TGF-β is associated with latent transforming growth factor B–binding proteins (LTBPs) inside the cell form the large latent complex (LLC). TGF-β is secreted in a latent dimeric complex containing the C-terminal mature TGF-β and its N-terminal pro-domain, LAP (TGF-β latency associated protein). Proteolytic activation via matrix metalloproteinases (MMPs) and reactive oxygen species (ROS) are associated with the TGF-β activation mechanism, releasing an active dimer to elicit signaling. GDF11 (active form), a TGF-β signaling factor (407 amino acids) exerts its effects by binding to specific receptors. Members of TGF-β family bind to activin-receptor-like-kinase: ALK-Type I and Type II. ALK-I induces phosphorylation of Smads. Ligands of various TGF-β receptors lead to recruitment and activation of Smads transcription factors that regulate gene expression in nucleus. Differences in GDF11 expression and cellular effects vary depending on tissue localization.

3. The Surgical Technique of Parabiosis

In order to investigate the influences of an organism on its conjoined partner, animal models that "mimic" the natural phenomenon of conjoined twins were created. The surgical technique of physically connecting two living organisms was termed "parabiosis", from the Greek "para" (next to) and "bios" (life). Unlike transbiosis, there are no formal donors and hosts in parabiosis as each animal can be viewed as an equal partner in the pairing, each influencing the other animal called a parabiont. These methods have evolved over time and have involved the surgical connection of different body parts [23]. Use of the parabiotic model in studies of cutaneous wound healing to define the participation of circulating cells [24,25].

The technique was first introduced by the French physiologist Paul Bert in the 1860s. The surgical way involves skin incisions along the contiguous flanks of two animals (usually mice) and suturing adjacent skin flaps between the animals. The peritoneum is sutured together between the animals to form a common peritoneal cavity. The first studies started to graft animals of different ages to each other (heterochronic parabiosis (HP)) in order to investigate effects induced through exposure of an aged organism to a youthful systemic environment. In HP, the parabiotic pairing of two animals is of different ages. Parabiotic pairings between two young (Y) mice or two old (O) mice are isochronic parabiosis (IP). It is an experimental system to test for systemic effects on the process of tissue aging. Collecting verification has indicated that the blood of young animals holds powerful "factors of youth".

4. Does GDF11 Reverse Age-Related Functional Impairment in Heart?

As we reported previously, cardiac hypertrophy is a prominent pathological feature of age-related heart failure. Using the parabiosis model, it has been demonstrated that age-related cardiac hypertrophy can be reversed via exposure to a young circulatory environment. These experiments revealed that age-related cardiac hypertrophy is at least in part mediated by circulating factors, such as GDF11, which is able to reverse the condition [26]. The authors generated HP pairs, in which Y female C57BL/6 mice (Y-HP, 2 months) were surgically joined to O-partners (O-HP, 23 months), and compared these with IP pairs (Y-Y, Y-IP, or O–O, O-IP), joined at identical ages, and to age- and sex-matched unpaired mice as controls. Parabiotic pairs were continued for 4 weeks before analysis. The hearts from old mice exposed to a young circulation (O-HP) for these 4 weeks were patently smaller than hearts from O-IP mice. The reduction of cardiac hypertrophy was associated with changes in cellular hypertrophy. This effect is evaluated by morphometric analysis of cardiac histologic sections. The reversal of cardiac hypertrophy in old mice exposed to a young circulation cannot be explained by a reduction in blood pressure in the older mice. An extensive proteomics analysis was performed on the serum and plasma of the animals. GDF11 was reduced in the circulation of aged mice and its levels were restored to those in young animals by HP. A significant decrease was also found in both GDF11 gene expression and GDF11 protein levels in the spleens of old mice. These results suggest exciting therapeutic approaches for the management of age-related cardiac hypertrophy by restoring youthful levels of circulating GDF11. Much work remains to be done to establish the efficacy of GDF11 as a therapeutic rejuvenation factor [27]. Recently, the goal of a study in old mice [28] was to reexamine the possibility to restore youthful levels of GDF11 by injecting rGDF11 and thus reversing cardiac hypertrophy and imparting a young phenotype to the old heart. The conclusions were that recombinant GDF11 (rGDF11) had no effect on cardiac structure and cardiac pump function; these results do not support the concept that GDF11 could be an anti-aging compound. An important study was published in the clinical cardiovascular field, analyzing the Heart and Soul and HUNT3 cohorts. It was demonstrated, in patients with stable ischemic heart disease, that higher GDF11/8 levels were associated with a lower risk of cardiovascular events and death, suggesting cardioprotective properties of GDF11/8 [29].

Various studies have identified a second factor in blood from mice that mediates rejuvenating actions, a chemokine: C-C motif chemokine 1, CCL11 [30]. CCL11 is also known as eosinophil chemotactic protein. In contrast to GDF11, levels of CCL11 increase with age (Figure 2). Increased

circulating levels of CCL11 have been implicated in diseases associated with abnormal central nervous system function, including Alzheimer disease [31].

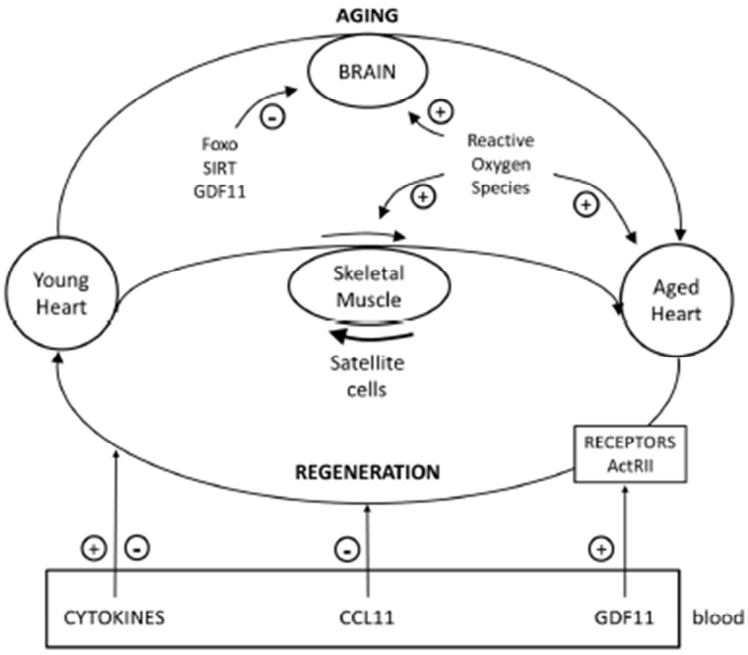


Figure 2. Age-related functional impairment in the heart, skeletal muscle, and brain—regenerative pathways. Systemic factors can affect aging-associated events, either positively or negatively. "Pro-youthful" factors, such as GDF11, present in young or aged blood may be able to improve cardiac regeneration. Another factor in blood is the chemokine (C-C motif) chemokine 11: CCL11. Age-related heart failure can be reversed by exposure to GDF11. During aging, there is a significant decline in skeletal muscle regenerative function and muscle satellite cells are responsible for the regeneration capacity of the muscle. Age-related mechanisms impair the function of the neurovascular unit in the brain. Foxo, SIRT, GDF11, and reactive oxygen species are modulators of the age-related process.

In the cardiovascular field, it is important to note the complex interplay of various cytokines in maintaining normal hematopoiesis. The process of differentiation of hematopoietic stem cells into mature blood cells is tightly regulated by the actions of both stimulatory and inhibitory cytokines. Recent studies suggest a new pathway for the treatment of anemia by targeting a newly discovered regulator of erythropoiesis via GDF11 [32].

GDF11 (active form: 407 amino-acids) exerts its effects by binding to specific receptors. Members of the TGF-β family bind to acting receptor-like-kinases: ALK-Type I and Type II. ALK-I induces phosphorylation of Smads (Figure 1). Studies reported that GDF11 Activin-type II receptors B(ActRIIB)-Smad2/3-dependent signaling is a key regulatory mechanism in proliferating erythroid precursors as it controls their late-stage maturation. New observations suggest that ActRIIA ligand traps may have therapeutic relevance in diseases such as beta-thalassemia by suppressing the deleterious effects of GDF11 [33]. The cycle is associated with changes in iron utilization caused by the decreased expression of hepcidin, the hormone that regulates iron uptake [34].

5. Does GDF11 Reverse Age-Related Functional Impairment in Skeletal Muscle?

Evidence indicates that skeletal muscle influences systemic aging. An age-dependent decline in skeletal muscle mass, strength, and endurance during the aging process is a physiological development and several factors may exacerbate this process. Capillaries are an integral part of the mechanism underlying this close matching between blood flow and metabolism of skeletal muscle mass. Capillaries have the capacity to play an active role in co-ordination of muscle blood flow responses to changed muscle metabolism [35].

Adult skeletal muscle possesses extraordinary regeneration capacities. Muscle satellite cells are responsible for the postnatal growth and major regeneration capacity of adult skeletal muscle. Aged serum increased the myogenic-to-fibrogenic conversion of young cells, whereas young serum had the opposite effect on aged cells [36]. The number of satellite cells is decreased during ageing, resulting in the attenuation of muscle regeneration capacity [37]. Several growth factors and cytokines such as TGF-β, and myostatin regulate muscle growth and repair [38,39]. Previous studies demonstrated that impaired regeneration in aged muscle can be reversed by HP, which exposes aged tissues to a youthful systemic environment and restores injury-induced satellite cell activation by the up-regulation of Notch signaling [40]. To determine whether supplementation of GDF11 from the young partner might underlie changes in skeletal muscle in heterochronic parabionts, aged mice were treated with daily intraperitoneal injections of rGDF11 to increase systemic GDF11 levels [41]. After 4 weeks, satellite cell frequency, determined by flow cytometry, and function increased in the muscles of rGDF11-treated mice, whereas other myofiber-associated mononuclear cell populations were unaffected. Aged mice treated with rGDF11 also showed increased numbers of satellite cells with intact DNA. These results indicate that GDF11 is able to regulate muscle aging and may be therapeutically suitable for skeletal muscle dysfunction.

6. Does GDF11 Reverse Age-Related Functional Impairment in Brain? Importance of the Neurovascular Unit

Normal human aging is a complex biological process that results from gradual phenotypic and functional changes of cells, which may be influenced by changes in their tissue microenvironment that occur with time. It has been demonstrated that alterations in brain structure and function are intimately tied to alterations in cognitive function. Age-related mechanisms impair the function of cells of the neurovascular unit. The brain must rely on the circulation for continuous supply of nutrients and oxygen, and for liberating metabolic spare products [42].

In humans and mice, the hippocampus and the hypothalamus are particularly vulnerable to aging. In addition to age-related differences in white and gray matter integrity, there is some evidence that age is associated with changes in the vascular system [43,44]. Older adults often have less activity in some regions, such as medial temporal areas during memory processing and visual regions across a variety of cognitive domains. A growing body of evidence shows that changes in the phenotypic and functional properties of human adult stem/progenitor cells may occur during aging and are associated with pathological consequences. Regeneration activity declines with age with the loss of stem/progenitor cell function. The brain is one of the organs that harbor a very small subpopulation of adult stem/progenitor cells, corresponding to about 0.1–3% of the total cell mass. Molecular mechanisms that may contribute to extending the longevity of adult stem/progenitor cells include their high telomerase activity, slow division, and high resistance to internal and external injuries [45].

Novel therapeutic approaches with multiple applications in humans have been conceived to reverse this chronological decline. These approaches include therapeutic strategies such as gene therapies and cell-replacement by using functional adult stem/progenitor cells [46]. Many pro-longevity signaling pathways, such as class O of forkhead box (Foxo) transcription factors and SIRT1, have been shown to play important roles in brain function. The manipulation of signaling molecules that impact Foxo and SIRT1 activities improved neuronal stress response capabilities to ROS and extended overall lifespan [47].

As we noted previously, several studies have reported that aged mice exposed to a young systemic environment exhibited reduced signs of biological aging in cardiovascular and skeletal muscle systems. The rejuvenating effects of young blood have now also been observed in the central nervous system of old mice. The rejuvenation of brain regeneration in aging organisms has been observed after HP. It has been reported that blood-borne factors, such as the chemokine CCL11, present in the systemic milieu were able to inhibit or promote adult neurogenesis in an age-dependent fashion in mice [48]. In a mouse model of demyelination, exposure of old mice to a youthful systemic environment increased myelination in the spinal cord of old heterochronic parabionts by recruiting young peripheral monocytes and promoting differentiation of oligodendrocyte progenitor cells [49]. Research has been done on whether or not the age-related decline in neurogenic function could be restored by extrinsic young signals, using a mouse heterochronic parabiosis model. It was demonstrated that aged cerebral vasculature was remodeled in response to young systemic factors, producing noticeably greater blood flow, associated with an activation of subventricular zone neural stem cell proliferation and enhanced olfactory neurogenesis, leading to an improvement in olfactory function. GDF11 was able to increase blood flow and neurogenesis in aged mice. In the context of aging, GDF11 appears to promote plasticity of the central nervous system [50]. It has been reported that old mice that received repeated injections of plasma from young animals exhibited increased learning and memory compared with old mice that received injections of old plasma. Structural and cognitive enhancements elicited by exposure to young blood are mediated, in part, by activation of the cyclic AMP response element binding protein in the aged hippocampus [30].

Cell culture experiments suggest that neurogenic rejuvenation is due to rGDF11-induced activation of the TGF-β signaling pathway in brain capillary endothelial cells, thus increasing their proliferation [50]. Ligand-receptor interactions in the TGF-β superfamily have been extensively studied. Biochemical experiments have demonstrated that GDF11 can activate Smad2, suggesting the involvement of ALK receptors in GDF11 signaling (Figure 1). It is important to recall that signaling through activin receptors is a therapeutic target in multiple diseases [51].

As previously reported, neurons, blood vessels, and neuroglia constitute the neurovascular unit. This unit appears fundamental for the brain metabolism and is regulated by numerous endogenous modulators. Recent evidence supports the hypothesis that, during inflammation, TGF- β can have an effect on the brain-wide pathway for fluid transport in the brain. The inhibition of inflammation appears to be a potential therapeutic strategy for neuro-inflammatory injury [52]. In this context, the role of GDF11 may be evoked; new investigations are required to determine the specific actions of GDF11 on the neurovascular unit and the blood–brain barrier permeability.

7. Limits and Criticism Concerning the Properties of GDF11: What is the Specificity of the Actions of GDF11?

As we reported, there is a high degree of identity between the GDF8/myostatin and GDF11 active domains. Like myostatin, the GDF11 protein is detectable in human serum [29] and signals through the activating receptors. GDF11 and GDF8 activate the same receptors. ActRIIB mediates multiple signals for TGF-beta family members, including activin, GDF8, and GDF11 [53]. As GDF11 and GDF8 are highly homologous, they are difficult to distinguish biochemically and by most commercial antibodies. When systemic GDF11 levels were evaluated without myostatin cross-reactivity, they were found to be 500× lower than those of myostatin. It has been suggested that reagents used in some studies were inadequate to determine whether GDF11 levels in old mice fell or increased after rGDF11 injection. It is important to use an assay with appropriate sensitivity and specificity for GDF11 detection [54].

A component of understanding the functional role of myostatin or GDF11 can be gleaned from studies of genetically modified mice. Genetic deficiency of GDF11 in mice causes profound developmental abnormalities, including agenesis of the kidneys and perinatal lethality [55,56]. The deletion of myostatin via gene targeting promoted both hypertrophy and hyperplasia of skeletal muscle, whereas postnatal inhibition of myostatin induced hypertrophy only [57]. In a study using

double myostatin, GDF11 mutants demonstrated that myostatin and GDF11 are both required for limb development and axial skeletal development and patterning. The effect of deletion of both factors on the axial skeleton was greater than for the loss of GDF11 alone. These results provide evidence that that myostatin and GDF11 have redundant functions in regulating skeletal development [58].

The potential role of GDF11 on skeletal muscle and heart should be viewed with caution according to the various and major properties of myostatin on skeletal cells. As we reported, knock-out (KO) mouse studies suggest myostatin affects skeletal muscle mass and also cardiac growth. However, the cardiac consequences of inhibiting myostatin remain unclear. Myostatin is a potent negative regulator of skeletal muscle growth and its inactivation can induce skeletal muscle hypertrophy, while its overexpression or systemic administration causes muscle atrophy [59]. GDF11 and activins exert an inhibitory effect on myocyte differentiation, similar to that induced by myostatin, and their activity is neutralized by follistatin [60].

Many questions remain about the role of the extracellular matrix and stem cells on muscle development, and factors determining the early differentiation of myogenic cells. Induced pluripotent stem (iPS) cells can be differentiated into cardiomyocytes, suggesting that iPS cells have the potential to significantly advance future cardiac regenerative therapies. The TGF-β signaling pathway is one of the important regulators of pluripotency. In this context, it is suggested that a lack of myostatin epigenetically reprograms the muscle derived stem cells (MDSCs) to become pluripotent stem cells. MDSCs are multipotent stem cells that can differentiate into skeletal muscle precursor cells [61]. Favorable effects of stem cells on perfusion and myocardial blood flow have been reported in a number of trials of cell therapy. Combining different types of stem cells lead to superior outcome in eliciting cardiac repair. Emerging approaches, including genetic modification, stem cell-derived exosomes, and new pharmacological drugs, have been applied to improve the efficacy of stem cell therapy [62]. It will be important to investigate the mechanisms that induce the myogenic effects of GDF11 with therapeutic possibilities for a variety of age-related diseases in association with cell therapy.

8. Summary

At a mechanistic level, evidence now exists that the beneficial effects of young blood on cognitive performance and cardiovascular function may be mediated by various rejuvenating factors and that many of the pro-longevity signaling pathways play important roles in organ functions. An important set of molecular mediators of regenerative capacity are those implicated in the TGF- β pathway [63] and hormones such as oxytocin [64]. At the level of cellular mechanisms, systemic inhibition of the TGF-beta type1 receptor enhanced both neurogenesis and myogenesis and normalized beta-2 microglobulin (B2M). Systemic B2M accumulation in aging blood promotes age-related cognitive dysfunction and impairs neurogenesis [65]. Furthermore, studies suggested that B2M could be a biomarker for CAD, with B2M being a predictor of all-cause mortality and adverse cardiac events in patients [66].

In conclusion, HP and old plasma administration studies have demonstrated the existence of "pro-aging" factors, such as negative regulators of regenerative capacity in peripheral tissues and the brain, and that impaired regenerative capacity is associated with alterations in cardiovascular and cognitive functions [67]. It will also be important to determine whether long-term treatment with rGDF11 has any negative consequences, especially since GDF11 is known to regulate cell proliferation in the development of multiple organ systems. The existence of possible field cancerization should be taken into consideration.

Author Contributions: All authors participated in the research and writing of the review.

Funding: This work was supported by grants from the French Ministry of Research, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Regional Council of Burgundy (Conseil Régional de Bourgogne), FEDER, and the Association de Cardiologie de Bourgogne.

Acknowledgments: The authors wish to thank Philip Bastable for English assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ACVRIIB	Activin receptor type IIB
ALK	Acting receptor-like-kinase
B2M	Beta-2 microglobulin
BMP	Bone morphogenetic proteins
CAD	Coronary artery disease
CCL11	C-C motif chemokine 1
CHF	Cardiac heart failure
CNS	Central nervous system
CVD	Cardiovascular disease
Foxo	Class O of forkhead box
GDF	Growth differentiation factor
HP	Heterochronic parabiotic
IP	Isochronic parabiotic
IPs	Induced pluripotent stem
MDSCs	Muscle derived stem cells
MI	Myocardial infarction
MMPs	Matrix metalloproteinases
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitrogen species
SIRT	Sirtuin
TGF	Transforming growth factor

References

1. Franceschi, C.; Bonafe, M.; Valensin, S.; Olivieri, F.; De Luca, M.; Ottaviani, E.; De Benedictis, G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, *908*, 244–254. [CrossRef] [PubMed]
2. Newgard, C.B.; Sharpless, N.E. Coming of age: Molecular drivers of aging and therapeutic opportunities. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 946–950. [CrossRef] [PubMed]
3. Freije, J.M.; Lopez-Otin, C. Reprogramming aging and progeria. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2012**, *24*, 757–764. [CrossRef] [PubMed]
4. Rota, M.; Leri, A.; Anversa, P. Human heart failure: Is cell therapy a valid option? *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *88*, 129–138. [CrossRef] [PubMed]
5. Leri, A.; Rota, M.; Hosoda, T.; Goichberg, P.; Anversa, P. Cardiac stem cell niches. *Stem Cell Res.* **2014**, *13*, 631–646. [CrossRef] [PubMed]
6. Oudot, A.; Martin, C.; Busseuil, D.; Vergely, C.; Demaison, L.; Rochette, L. NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 2214–2222. [CrossRef] [PubMed]
7. Rochette, L.; Lorin, J.; Zeller, M.; Guilland, J.C.; Lorgis, L.; Cottin, Y.; Vergely, C. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacol. Ther.* **2013**, *140*, 239–257. [CrossRef]
8. Cheitlin, M.D. Cardiovascular physiology-changes with aging. *Am. J. Geriat. Cardiol.* **2003**, *12*, 9–13. [CrossRef]
9. Demontis, F.; Piccirillo, R.; Goldberg, A.L.; Perrimon, N. The influence of skeletal muscle on systemic aging and lifespan. *Aging Cell* **2013**, *12*, 943–949. [CrossRef]
10. Wang, L.; Karpac, J.; Jasper, H. Promoting longevity by maintaining metabolic and proliferative homeostasis. *J. Exp. Biol.* **2014**, *217*, 109–118. [CrossRef]
11. Pillai, V.B.; Sundaresan, N.R.; Gupta, M.P. Regulation of Akt signaling by sirtuins: Its implication in cardiac hypertrophy and aging. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 368–378. [CrossRef] [PubMed]
12. Segers, V.F.; Lee, R.T. Protein therapeutics for cardiac regeneration after myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **2010**, *3*, 469–477. [CrossRef] [PubMed]

13. Haider, H.; Lei, Y.; Ashraf, M. MyoCell, a cell-based, autologous skeletal myoblast therapy for the treatment of cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2008**, *10*, 611–621. [PubMed]
14. Sanganalmath, S.K.; Bolli, R. Cell therapy for heart failure: A comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ. Res.* **2013**, *113*, 810–834. [CrossRef] [PubMed]
15. Rochette, L.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. Growth and differentiation factor 11 (GDF11): Functions in the regulation of erythropoiesis and cardiac regeneration. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *156*, 26–33. [CrossRef] [PubMed]
16. Kondas, K.; Szlama, G.; Nagy, A.; Trexler, M.; Patthy, L. Biological functions of the WAP domain-containing multidomain proteins WFIKKN1 and WFIKKN2. *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, *39*, 1416–1420. [CrossRef] [PubMed]
17. McPherron, A.C. Metabolic Functions of Myostatin and Gdf11. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 217–231. [CrossRef] [PubMed]
18. Egerman, M.A.; Cadena, S.M.; Gilbert, J.A.; Meyer, A.; Nelson, H.N.; Swalley, S.E.; Mallozzi, C.; Jacobi, C.; Jennings, L.L.; Clay, I.; et al. GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 164–174. [CrossRef]
19. Dschietzig, T.B. Myostatin—From the Mighty Mouse to cardiovascular disease and cachexia. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2014**, *433*, 216–224. [CrossRef]
20. Poggioli, T.; Vujic, A.; Yang, P.; Macias-Trevino, C.; Uygur, A.; Loffredo, F.S.; Pancoast, J.R.; Cho, M.; Goldstein, J.; Tandias, R.M.; et al. Circulating Growth Differentiation Factor 11/8 Levels Decline With Age. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 29–37. [CrossRef]
21. Brun, C.E.; Rudnicki, M.A. GDF11 and the Mythical Fountain of Youth. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 54–56. [CrossRef] [PubMed]
22. Kim, J.; Wu, H.H.; Lander, A.D.; Lyons, K.M.; Matzuk, M.M.; Calof, A.L. GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina. *Science* **2005**, *308*, 1927–1930. [CrossRef] [PubMed]
23. Conboy, M.J.; Conboy, I.M.; Rando, T.A. Heterochronic parabiosis: Historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Aging Cell* **2013**, *12*, 525–530. [CrossRef] [PubMed]
24. Song, G.; Nguyen, D.T.; Pietramaggiori, G.; Scherer, S.; Chen, B.; Zhan, Q.; Ogawa, R.; Yannas, I.V.; Wagers, A.J.; Orgill, D.P.; et al. Use of the parabiotic model in studies of cutaneous wound healing to define the participation of circulating cells. *Wound Repair Regen.* **2010**, *18*, 426–432. [CrossRef] [PubMed]
25. Kamran, P.; Sereti, K.I.; Zhao, P.; Ali, S.R.; Weissman, I.L.; Ardehali, R. Parabiosis in mice: A detailed protocol. *J. Vis. Exp. JoVE* **2013**. [CrossRef] [PubMed]
26. Loffredo, F.S.; Steinhauser, M.L.; Jay, S.M.; Gannon, J.; Pancoast, J.R.; Yalamanchi, P.; Sinha, M.; Dall'Osso, C.; Khong, D.; Shadrach, J.L.; et al. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell* **2013**, *153*, 828–839. [CrossRef] [PubMed]
27. Mendelsohn, A.R.; Larrick, J.W. Rejuvenation of aging hearts. *Rejuv. Res.* **2013**, *16*, 330–332. [CrossRef] [PubMed]
28. Smith, S.C.; Zhang, X.; Zhang, X.; Gross, P.; Starosta, T.; Mohsin, S.; Franti, M.; Gupta, P.; Hayes, D.; Myzithras, M.; et al. GDF11 does not rescue aging-related pathological hypertrophy. *Circ. Res.* **2015**, *117*, 926–932. [CrossRef]
29. Olson, K.A.; Beatty, A.L.; Heidecker, B.; Regan, M.C.; Brody, E.N.; Foreman, T.; Kato, S.; Mehler, R.E.; Singer, B.S.; Hveem, K.; et al. Association of growth differentiation factor 11/8, putative anti-ageing factor, with cardiovascular outcomes and overall mortality in humans: Analysis of the Heart and Soul and HUNT3 cohorts. *Eur. Heart J.* **2015**, *36*, 3426–3434. [CrossRef]
30. Villeda, S.A.; Plambeck, K.E.; Middeldorp, J.; Castellano, J.M.; Mosher, K.I.; Luo, J.; Smith, L.K.; Bieri, G.; Lin, K.; Berdnik, D.; et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 659–663. [CrossRef]
31. Leung, R.; Proitsi, P.; Simmons, A.; Lunnon, K.; Guntert, A.; Kronenberg, D.; Pritchard, M.; Tsolaki, M.; Mecocci, P.; Kloszewska, I.; et al. Inflammatory proteins in plasma are associated with severity of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e64971. [CrossRef] [PubMed]
32. Suragani, R.N.; Cadena, S.M.; Cawley, S.M.; Sako, D.; Mitchell, D.; Li, R.; Davies, M.V.; Alexander, M.J.; Devine, M.; Loveday, K.S.; et al. Transforming growth factor-beta superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 408–414. [CrossRef] [PubMed]
33. Dussiot, M.; Maciel, T.T.; Fricot, A.; Chartier, C.; Negre, O.; Veiga, J.; Grapton, D.; Paubelle, E.; Payen, E.; Beuzard, Y.; et al. An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 398–407. [CrossRef] [PubMed]

34. Rochette, L.; Gudjoncik, A.; Guenancia, C.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. The iron-regulatory hormone hepcidin: A possible therapeutic target? *Pharmacol. Ther.* **2015**, *146*, 35–52. [CrossRef] [PubMed]
35. Murrant, C.L.; Sarelius, I.H. Coupling of muscle metabolism and muscle blood flow in capillary units during contraction. *Acta Physiol. Scand.* **2000**, *168*, 531–541. [CrossRef] [PubMed]
36. Brack, A.S.; Conboy, M.J.; Roy, S.; Lee, M.; Kuo, C.J.; Keller, C.; Rando, T.A. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* **2007**, *317*, 807–810. [CrossRef]
37. Motohashi, N.; Asakura, A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Front. Cell Dev. Biol.* **2014**, *2*, 1. [CrossRef] [PubMed]
38. Burks, T.N.; Cohn, R.D. Role of TGF-beta signaling in inherited and acquired myopathies. *Skeletal Muscle* **2011**, *1*, 19. [CrossRef]
39. Brooks, N.E.; Myburgh, K.H. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: The response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 99. [CrossRef]
40. Conboy, I.M.; Conboy, M.J.; Wagers, A.J.; Girma, E.R.; Weissman, I.L.; Rando, T.A. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **2005**, *433*, 760–764. [CrossRef]
41. Sinha, M.; Jang, Y.C.; Oh, J.; Khong, D.; Wu, E.Y.; Manohar, R.; Miller, C.; Regalado, S.G.; Loffredo, F.S.; Pancoast, J.R.; et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science* **2014**, *344*, 649–652. [CrossRef] [PubMed]
42. Tarantini, S.; Tran, C.H.T.; Gordon, G.R.; Ungvari, Z.; Csiszar, A. Impaired neurovascular coupling in aging and Alzheimer's disease: Contribution of astrocyte dysfunction and endothelial impairment to cognitive decline. *Exp. Gerontol.* **2017**, *94*, 52–58. [CrossRef] [PubMed]
43. Hillary, F.G.; Biswal, B. The influence of neuropathology on the FMRI signal: A measurement of brain or vein? *Clin. Neuropsychol.* **2007**, *21*, 58–72. [CrossRef] [PubMed]
44. Grady, C.L. Cognitive neuroscience of aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1124*, 127–144. [CrossRef] [PubMed]
45. Flores, I.; Canela, A.; Vera, E.; Tejera, A.; Cotsarelis, G.; Blasco, M.A. The longest telomeres: A general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 654–667. [CrossRef] [PubMed]
46. Mimeault, M.; Batra, S.K. Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications. *Ageing Res. Rev.* **2009**, *8*, 94–112. [CrossRef]
47. Lee, K.S.; Iijima-Ando, K.; Iijima, K.; Lee, W.J.; Lee, J.H.; Yu, K.; Lee, D.S. JNK/FOXO-mediated neuronal expression of fly homologue of peroxiredoxin II reduces oxidative stress and extends life span. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 29454–29461. [CrossRef]
48. Villeda, S.A.; Luo, J.; Mosher, K.I.; Zou, B.; Britschgi, M.; Bieri, G.; Stan, T.M.; Fainberg, N.; Ding, Z.; Eggel, A.; et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* **2011**, *477*, 90–94. [CrossRef]
49. Ruckh, J.M.; Zhao, J.W.; Shadrach, J.L.; van Wijngaarden, P.; Rao, T.N.; Wagers, A.J.; Franklin, R.J. Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system. *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 96–103. [CrossRef]
50. Katsimpardi, L.; Litterman, N.K.; Schein, P.A.; Miller, C.M.; Loffredo, F.S.; Wojtkiewicz, G.R.; Chen, J.W.; Lee, R.T.; Wagers, A.J.; Rubin, L.L. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science* **2014**, *344*, 630–634. [CrossRef]
51. Tsuchida, K.; Nakatani, M.; Uezumi, A.; Murakami, T.; Cui, X. Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. *Endocr. J.* **2008**, *55*, 11–21. [CrossRef] [PubMed]
52. Xiang, B.; Xiao, C.; Shen, T.; Li, X. Anti-inflammatory effects of anisalcohol on lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia via selective modulation of microglia polarization and down-regulation of NF-kappaB p65 and JNK activation. *Mol. Immunol.* **2018**, *95*, 39–46. [CrossRef] [PubMed]
53. Chang, H.; Brown, C.W.; Matzuk, M.M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr. Rev.* **2002**, *23*, 787–823. [CrossRef] [PubMed]
54. McNally, E.M. Questions and Answers About Myostatin, GDF11, and the Aging Heart. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 6–8. [CrossRef] [PubMed]
55. McPherron, A.C.; Lawler, A.M.; Lee, S.J. Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 260–264. [CrossRef] [PubMed]

56. Yu, J.; McMahon, A.P.; Valerius, M.T. Recent genetic studies of mouse kidney development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2004**, *14*, 550–557. [CrossRef] [PubMed]
57. Girgenrath, S.; Song, K.; Whittemore, L.A. Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. *Muscle Nerve* **2005**, *31*, 34–40. [CrossRef] [PubMed]
58. McPherron, A.C.; Huynh, T.V.; Lee, S.J. Redundancy of myostatin and growth/differentiation factor 11 function. *BMC Dev. Biol.* **2009**, *9*, 24. [CrossRef] [PubMed]
59. Rodriguez, J.; Vernus, B.; Chelh, I.; Cassar-Malek, I.; Gabillard, J.C.; Hadj Sassi, A.; Seiliez, I.; Picard, B.; Bonnieu, A. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2014**, *71*, 4361–4371. [CrossRef] [PubMed]
60. Gilson, H.; Schakman, O.; Kalista, S.; Lause, P.; Tsuchida, K.; Thissen, J.P. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, *297*, E157–E164. [CrossRef] [PubMed]
61. Bose, B.; Shenoy, P.S. Pluripotent Conversion of Muscle Stem Cells Without Reprogramming Factors or Small Molecules. *Stem Cell Rev.* **2016**, *12*, 73–89. [CrossRef] [PubMed]
62. Wang, Z.; Su, X.; Ashraf, M.; Kim, I.M.; Weintraub, N.L.; Jiang, M.; Tang, Y. Regenerative Therapy for Cardiomyopathies. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **2018**. [CrossRef] [PubMed]
63. Yousef, H.; Conboy, M.J.; Morgenthaler, A.; Schlesinger, C.; Bugaj, L.; Paliwal, P.; Greer, C.; Conboy, I.M.; Schaffer, D. Systemic attenuation of the TGF-beta pathway by a single drug simultaneously rejuvenates hippocampal neurogenesis and myogenesis in the same old mammal. *Oncotarget* **2015**, *6*, 11959–11978. [CrossRef] [PubMed]
64. Elabd, C.; Cousin, W.; Upadhyayula, P.; Chen, R.Y.; Chooljian, M.S.; Li, J.; Kung, S.; Jiang, K.P.; Conboy, I.M. Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4082. [CrossRef] [PubMed]
65. Smith, L.K.; He, Y.; Park, J.S.; Bieri, G.; Snethlage, C.E.; Lin, K.; Gontier, G.; Wabl, R.; Plambeck, K.E.; Udeochu, J.; et al. beta2-microglobulin is a systemic pro-aging factor that impairs cognitive function and neurogenesis. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 932–937. [CrossRef] [PubMed]
66. Zhang, C.; Li, F.; Long, T.; Li, F.; Peng, L.; Xia, K.; Jing, R.; Xie, Q.; Yang, T. Beta 2-Microglobulin and the Severity of Coronary Stenosis in Patients With Acute Coronary Syndrome. *Heart Lung Circ.* **2018**. [CrossRef] [PubMed]
67. Bouchard, J.; Villeda, S.A. Aging and brain rejuvenation as systemic events. *J. Neurochem.* **2015**, *132*, 5–19. [CrossRef] [PubMed]

© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Review

The Role of Osteoprotegerin and Its Ligands in Vascular Function

Luc Rochette [1,*], Alexandre Meloux [1], Eve Rigal [1], Marianne Zeller [1], Yves Cottin [1,2] and Catherine Vergely [1]

[1] Equipe d'Accueil (EA 7460): Physiopathologie et Epidémiologie Cérébro-Cardiovasculaires (PEC2), Université de Bourgogne–Franche Comté, Faculté des Sciences de Santé, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France; alexandre.meloux@gmail.com (A.M.); eve.rigal@u-bourgogne.fr (E.R.); marianne.zeller@u-bourgogne.fr (M.Z.); yves.cottin@chu-dijon.fr (Y.C.); catherine.vergely@u-bourgogne.fr (C.V.)

[2] Service de Cardiologie–CHU-Dijon, 21000 Dijon, France

* Correspondence: luc.rochette@u-bourgogne.fr

Received: 15 January 2019; Accepted: 2 February 2019; Published: 6 February 2019

check for updates

Abstract: The superfamily of tumor necrosis factor (TNF) receptors includes osteoprotegerin (OPG) and its ligands, which are receptor activators of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). The OPG/RANKL/RANK system plays an active role in pathological angiogenesis and inflammation as well as cell survival. It has been demonstrated that there is crosstalk between endothelial cells and osteoblasts during osteogenesis, thus establishing a connection between angiogenesis and osteogenesis. This OPG/RANKL/RANK/TRAIL system acts on specific cell surface receptors, which are then able to transmit their signals to other intracellular components and modify gene expression. Cytokine production and activation of their receptors induce mechanisms to recruit monocytes and neutrophils as well as endothelial cells. Data support the role of an increased OPG/RANKL ratio as a possible marker of progression of endothelial dysfunction in metabolic disorders in relationship with inflammatory marker levels. We review the role of the OPG/RANKL/RANK triad in vascular function as well as molecular mechanisms related to the etiology of vascular diseases. The potential therapeutic strategies may be very promising in the future.

Keywords: osteoprotegerin; OPG/RANKL/RANK; endothelium; vascular disease

1. Introduction

Among the numerous molecules being studied for their potential utility as biomarkers of cardiovascular diseases (CVD), much attention is being given to the superfamily of tumor necrosis factor (TNF) receptors. Members of this family include osteoprotegerin (OPG) and its ligands, which are receptor activators of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). TRAIL is a member of the TNF superfamily (TNFSF) and interacts with members of the TNF receptor superfamily (TNFRSF) [1,2]. OPG expression is regulated both positively and negatively by a wide array of factors, such as TNF and glucocorticoids. TNF is a central pro-inflammatory cytokine that controls the expression of numerous signaling pathways implicated in the progression of immunological reactions in relationship with the development of various diseases—vascular and metabolic diseases. Increased OPG production represents an early event in the development of diabetes mellitus and possibly contributes to diseases associated with endothelial cell (EC) dysfunction. The plasma OPG level is significantly coupled with endothelial function and the OPG serum level has a significant and independent predictive value for metabolic syndrome as a standard for cardiovascular risk in osteoporotic patients [3].

The balance between bone breakdown and reformation is modulated to a large extent by the secreted soluble receptor OPG. Recent studies have elucidated the crosstalk between ECs and osteoblasts during osteogenesis, thus connecting angiogenesis with osteogenesis. A relationship between bone regulatory proteins and vascular biology is now proposed. It has been demonstrated that OPG may mediate vascular calcification. Vascular calcification is a risk factor of cardiovascular and all-cause mortality in diseased patients. However, the cellular mechanisms involved in the links between vascular calcification and cardiovascular disease are mainly unknown, but growing evidence suggests that the RANK/RANKL/OPG triad may play a significant role in vascular calcification. In this article, we review the role of the OPG/RANKL/RANK/TSP/TRAIL system in endothelial metabolism and function as well as molecular mechanisms involving OPG related to the development of disease. New investigations are crucial to improving our knowledge in this area.

2. The OPG/RANKL/RANK/TRAIL System: Structures, Localization, and Characterization

OPG is a cytokine of the TNF receptor superfamily. It was named OPG because of its protective effects in bone (in Latin, "os" is bone and "protegere" is to protect). OPG is also known as osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or TNF receptor superfamily member 11b: (TNFRS11B). OPG is encoded by the TNFRSF11B gene. RANKL (TNFSF11) and RANK (TNFRSF11A), a receptor ligand pair of the TNF receptor superfamily, have emerged as the key molecular pathway in bone metabolism. (Figure 1).

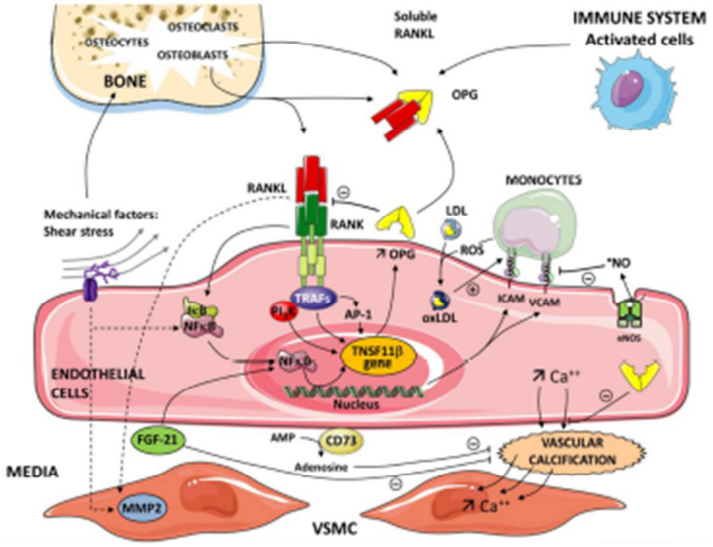


Figure 1. Critical role of the nuclear factor kappa-B/nuclear factor kappa-B ligand/osteoprotegerin (RANK/RANKL/OPG) axis in the pathogenesis of inflammatory processes and vascular calcification. OPG is produced by different cells—activated cells (immune system), osteoblasts in bone. The inflammatory cells and immune cells up-regulate expression of receptor activator of the RANKL. A soluble form of RANKL, sRANKL, also circulates in the blood. The interaction between RANK and RANKL initiates a signaling and gene expression cascade, activating the transcription factor NF-κB. OPG binds to RANKL and prevents the RANKL/RANK interaction. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factors (TRAFs 2,5,6) to specific sites are present in the cytoplasmic domain of RANK. Subendothelial retention of low-density lipoprotein (LDL) and its oxidative modification

(OxLDL) represent the initial event in atherogenesis. Reactive oxygen species (ROS) generated by monocytes contribute to the level of oxidation of LDL. OxLDLs induce endothelial cell (EC) expression of adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1). Nitric oxide (NO) generated in the endothelium by the catalytic action of the enzyme nitric oxide synthase (eNOS) reduces the endothelial expression of ICAM-1 and VCAM-1. In the nucleus of ECs, via NF-κB and AP-1, OPG induces the expression of ICAM-1 and VCAM-1 and promotes leukocyte adhesion, an early step in ECs dysfunction. Various pathways and mediators are involved in vascular calcification depending on the etiology of the atherosclerosis. Vascular calcification is an active cell-regulated process of mineralization implicating matrix mineral metabolism. Sensors and effectors associated with shear stress regulate cellular functions and gene expression via the activation of NF-κB target genes. Osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells (VSMC) plays a pivotal role in the progression of vascular calcification. RANK-RANKL-OPG and other regulatory proteins are major pathways in the progression of vascular calcification. Fibroblast growth factor21 (FGF21) and Ecto-5′-nucleotidase (CD73) contribute to the regulation of this calcification. FGF21 protects the vascular system by limiting VSMC calcification. CD73 hydrolyses extracellular AMP to adenosine. Adenosine has been shown to play a protective role against calcification.

Biochemically, OPG is a basic secretory glycoprotein composed of 401 amino acids (aa) with a monomeric weight of 60 kiloDaltons (kD). It is then assembled at the cys-400 residue in the heparin binding domain to form a 120 kD disulfide-linked dimer for secretion. OPG contains seven structural domains, which influence its biological activities in specific ways. Prior to secretion of the monomeric and dimeric forms of OPG, the 21 aa signal peptide is cleaved from the N-terminal, rendering a 380 aa mature OPG protein. Subsequently, circulating OPG exists either as a free monomer of 60 kD and a disulfide bond-linked homodimer form of 120 kD or as OPG bound to its ligands, RANKL, and TRAIL.

RANKL is a transmembrane protein, but a soluble form (soluble RANKL is sRANKL) also circulates in the blood. RANKL binds as a homotrimer to RANK on target cells, which triggers activation of nuclear factor κB (NF-κB). A key preliminary step in downstream signaling after RANKL ligation to RANK is the binding of TNF receptor-associated factors (TRAFs: 2,5,6) to specific sites in the cytoplasmic domain of RANK. TRAFs 2, 5, and 6 all bind to RANK. Several signaling pathways are activated by RANK/TRAF-mediated protein kinase signaling, such as NF-κB kinase (IKB)/NF-κB and activator protein-1, AP-1. Recently, it has become increasingly clear that these signaling pathways are present in various cells during vascular calcification [4].

OPG binds RANKL through its N-terminal cysteine-rich domains (CRD). The extracellular region of OPG consists of four CRDs, and each domain contains topologically distinct modules. CRDs are sufficient to inhibit RANKL [5]. Human RANK consists of 616 aa. These aa are divided into a C-terminal cytoplasmic domain of 383 aa, an N-terminal extracellular domain of 184 aa, a signal peptide of 28 aa, and a transmembrane domain of 21 aa, which contains four cysteine and two N-glycosylation sites. RANKL generates multiple intracellular signals by binding to RANK-TRAIL. TRAIL and its associated receptors exhibit broad tissue distribution. TRAIL mRNA and protein have been found in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and ECs. TRAIL is expressed as a type II transmembrane protein. TRAIL also exists physiologically in a biologically active soluble homotrimeric form. TRAIL, also known as Apo2 ligand, is detectable in the serum under physiological conditions. TRAIL in its soluble form is detected at concentrations of 10–100 pg/mL in the serum/plasma. TRAIL can bind up to five distinct receptors to activate complex signaling pathways. OPG has also been noted to bind to TRAIL. An essential role of the TRAIL/TRAIL-R system is in the regulation and modulation of apoptosis. TRAIL may have a dual function in the immune system by being able to kill infected cells and by participating in the pathogenesis of multiple infections [6]. Interestingly, it has been suggested that TRAIL may also play a role in atherosclerotic plaque development. TRAIL is expressed in atherosclerotic lesions with increased levels seen at vulnerable plaque sites. Recent results suggest that the elevated levels of TRAIL present in atherosclerotic plaque could be harmful by intensifying the inflammatory response and reinforcing plaque formation. Some laboratories demonstrated increased apoptosis in TRAIL-treated EC, while other groups have shown increased survival and proliferation of

these cells in response to TRAIL. It appears that TRAIL has pleiotropic effects within the vasculature [7]. In the literature, a number of studies have shown that soluble TRAIL is able to induce the activation of some signal transduction pathways, promoting the survival of VSMCs and ECs. TRAIL also exerts a protective effect on the endothelium through its anti-inflammatory properties and the production of local nitric oxide (NO) [8]. Recently, there has been outstanding progress in the development of novel formulations to increase the circulatory half-life of TRAIL, thus improving the biological attributes of TRAIL-based therapies.

Greater interest has been shown in improving our understanding of the interaction mechanism between RANKL and OPG, as manipulation of the OPG/RANKL ratio could be the basis for the development of new therapeutics. Besides binding RANK, OPG is able to interact with TRAIL and induces apoptosis of tumor cells through the cell-surface receptors death receptor 4 (DR4) and DR5 in the TNFRSF family [9]. The binding mode to RANKL was determined from computational docking and molecular dynamics simulations [10,11]. OPG is expressed in vivo by ECs, VSMCs, and osteoblasts. OPG has been detected by immunohistochemistry in aortic and coronary atherosclerotic plaques within or in the proximity of VSMCs [12,13].

OPG is released under basal conditions by ECs upon stimulation with inflammatory cytokines, hormones, and various circulating compounds. TNF-α and interleukin (IL)-1β were found to increase OPG levels. Within ECs, OPG is associated with von Willebrand factor (vWF) within secretory granules called Weibel-Palade bodies (WPBs). The size of vWF multimers can be controlled by the glycoprotein thrombospondin-1 (TSP-1). TSP-1 acts from within the endoplasmic reticulum to activate nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2), inducing a protective antioxidant defense response against lipotoxic stress [14].

In vitro experiments show that OPG can be produced and also released by blood cells such as neutrophils and stem cells. Neutrophils produce OPG and IL-17. IL-17 increases the recruitment of neutrophils at the site of inflammation and influences the production of various proinflammatory mediators [15,16]. A recent study reported a significant elevation of circulating OPG in septic patients with different levels of severity and in those who progressed to acute kidney injury; OPG thus appears to be a reliable biomarker [17].

OPG is also released by various kinds of stem cells. Vascular stem/progenitor cells (VSCs) are an important source of all types of vascular cells needed to build and repair blood vessels. There are several types of VSCs, including endothelial progenitor cells (EPCs), smooth muscle progenitor cells (SMPCs), mesenchymal stem cells, and adipose-stromal cells (ASCs). ASCs are one of the most important and promising cell sources in the field of regenerative medicine. Recently, the production of OPG by ASCs and its role in vascular pathophysiology were examined. It was demonstrated that OPG generated apoptosis of EPCs by inducing oxidative stress. This effect was mediated by syndecan-4 and oxidative stress. Syndecans are plasma membrane proteoglycans, and oxidative stress alters syndecan-distribution in tissues. OPG-induced apoptosis was abolished by reactive oxygen species (ROS) scavengers such as *N*-acetylcysteine and the NADPH oxidase (NOX) inhibitor, diphenyleneiodonium. OPG increased ROS production through activation of NOX-2 and NOX-4 and triggered phosphorylation of ERK-1/2 and p38 MAPK [18]. In ASCs, the link between oxidative stress, apoptosis, and OPG was recently confirmed. Hydrogen peroxide (H_2O_2) significantly increased OPG production by ASCs in vitro. OPG production by ASCs transplanted into ischemia–reperfusion-injured hearts was also observed. It was suggested that OPG is one of the protector factors released by ASCs contributing to ASC-mediated cardioprotection. However, the mechanisms of OPG-mediated cellular protection have not yet been completely elucidated [19].

A number of polymorphisms in the promoter region of the OPG gene have been described in different diseases. Each polymorphism has been evaluated in specific diseases. Various studies have been designed to evaluate the association between polymorphisms of the OPG gene, the serum OPG level, and the advance of atherosclerosis associated (or not) with rheumatoid arthritis (RA). One

polymorphism of the TNFRSF11B gene has been coupled with the presence of coronary atherosclerosis in patients with RA [20].

Finally, elevated OPG levels are associated with markers of inflammation, endothelial dysfunction, oxidative stress, and CVD [2].

3. Interactions between OPG/RANKL/RANK and Endogenous Factors in the Heart: Incidences on Metabolism and Functions of Endothelial Cells.

The human heart consists of a variety of cell types with fibroblasts and other connective tissue cells being the most abundant [21]. The remaining cell mass consists of cardiomyocytes, EC, VSMCs, mast cells, and immune-related cells. However, CM mass is approximately 25 times that of EC mass. Cardiomyocytes are the major consumers of oxygen in the heart and account for approximately 75% of normal myocardial volume, and there is at least one capillary adjacent to every cardiomyocyte. Cardiomyocytes are outnumbered ≈3:1 by ECs in the microvasculature and small vessels in the myocardium [22].

The endothelium is one of the largest "organs" in the body and probably also one of the most heterogeneous. The endothelium includes a large collection of EC subtypes differing in phenotype, function, and location. The different ECs adapt the flux through the metabolic pathways in relationship with the specific energy sources, the redox balance, and precise metabolisms [23].

In healthy adults, ECs are quiescent and exert a barrier function and maintain tissue homeostasis. They have the capacity to form new vasculature in response to angiogenic factors induced by injury and/or pathological conditions, such as hypoxia or tissue damage. In the myocardium, capillary EC, in situ, are able to change shape against a continuous flow and adapt to the contractive environment [23]. Metabolic activities in ECs are different from those in other cells, whose cellular bioenergetics are linked to oxidative mitochondrial metabolism. ECs can alter their phenotypes and switch among different states—migrating, proliferative, and quiescent.

ECs of the microcirculation are fundamental for myocardial function, which largely depends on the ratio between energy metabolites received from the coronary circulation and their use by cardiomyocytes. Endothelial tissue originating from different organs may differ in terms of its metabolic profile. ECs have a smaller number of mitochondria than other cell types and therefore consume lower amounts of oxygen. Likewise, the intracellular distribution of mitochondria varies among the different EC and suggests their important regulatory roles in cellular homeostasis. ECs generate up to 85% of their ATP through aerobic glycolysis. Interestingly, the rate of glycolysis differs in EC subtypes. Arterial ECs are more oxidative, whereas microvascular ECs are more glycolytic [24]. Despite the adaptation of ECs to use glucose, they also need other metabolic sources of energy to carry out their functions. Fatty acids (FAs) catabolized by fatty acid-beta-oxidation (FAO) are an important fuel for ECs during sprouting [25]. The regulation of FAO is modulated by a variety of influences, including the peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs) family of transcription factors. High FA levels activate PPAR-α and thereby increase FAO.

The heart is capable of remodeling metabolic pathways in chronic pathophysiological conditions, which results in modulations of myocardial energetics and contractile function. Because high-energy phosphate storage within the cardiomyocyte is minimal and only sufficient to maintain the heart beat for a few seconds, a strong coupling of ATP production and heart contraction is necessary for normal cardiac function [26]. To preserve its function, the heart, a high-energy organ, exhibits "plasticity" in its ability to use multiple substrates for energy production, including FAs, carbohydrates, and ketone bodies. In cardiomyocytes, FAs are predominantly used as an energy source.

In the normal heart, nearly 70% of ATP is produced from FA oxidation. The heart has a high demand for FA, but it has a restricted capacity to synthesize FA and thus depends on an exogenous source of FA. FAs are delivered inside the capillary lumen through the hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase. In this context, ECs play a key function. In the heart, ECs express the FA-binding proteins FABP4 and FABP5, which transport FAs across the endothelium [27]. Vascular

endothelial growth factors-B (VEGF)-B secreted by cardiac and skeletal muscle and brown adipose tissue produces the FA transport proteins via VEGF receptor 1 in capillary ECs [28].

Endothelial senescence could play a significant role in cardiac diseases such as hypertrophy, and in this state, it is well established that cardiac metabolism undergoes reprogramming. These changes are characterized by increased glucose metabolism and decreased FAO. Concerning the impact on glucose metabolism, the upregulation of glucose uptake associated with decreases in overall ATP synthesis by oxidative metabolism is observed, and glycolysis is thus increased [29]. While increased glucose utilization appears to be beneficial for the failing heart, decreased FA supply to the hypertrophied and failing heart seems to be detrimental. The shift in substrate preference to glucose in pathological hypertrophy was considered adaptive given the theoretically higher oxygen efficiency of ATP synthesis from glucose [30]. In conclusion, there is crosstalk between the endothelium and cardiomyocytes, and metabolic maladaptation can impair cardiac function.

An interesting link exists between ATP/adenosine metabolism and the functions of the OPG/RANK/RANKL triad. Adenosine may either be released from the intracellular space by exocytosis or may generate by the enzymatic breakdown of extracellular ATP. Adenosine exerts a variety of physiological effects by binding to cell surface G-protein-coupled receptor subtypes A1, A2a, A2b, and A3. In various organs, the role of adenosine is to prevent tissue injury; it acts as a cytoprotective modulator. In vitro, in a human osteoprogenitor cell line, it has been shown that adenosine and adenosine receptor agonists inhibited OPG secretion [31]. In rheumatoid arthritis (RA) patients, the OPG/RANKL ratio is elevated in blood samples and the A3AR is over-expressed in inflammatory cells. These data reflect in these patients the autoimmune inflammatory disease [32,33]. RA accelerates atherosclerosis and increases occurrence of vascular diseases. The development of metabolomic analysis is able to clarify the interactions between inflammation and metabolic changes underlying many diseases, such as RA.

ECs produce high levels of OPG in response to stimulation by lipopolysaccharides or other activators [34,35]. Yet, OPG affects the cytoskeletal organization of ECs via its molecular effects. In vitro, treatment of ECs with OPG induced the reorganization of the cytoskeleton of endothelial colony-forming cells (ECFCs). ECFCs, also termed late-outgrowth ECs, are a well-defined circulating EPC type with an established role in vascular repair. OPG induced activation of αVβ3 integrin and the regulation of its ligand, protein-disulfide-isomerase. In addition to its role in cell migration, αVβ3 integrin promotes the survival of stimulated ECs [36]. In this context, heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) may regulate OPG bioavailability. Proteoglycans of the syndecan family are involved in modulating integrin-mediated tight adhesion of leukocytes to the endothelium. On the other hand, HSPGs immobilize chemokines on luminal ECs, thus protecting them against mechanical or hemodynamic variations [37].

Abnormalities of HSPGs have been found in mitral valve degeneration. Isolated human valve ECs exhibited evidence of endothelial to mesenchymal transition (EndMT) [38]. Data reported in a recent study validated the hypothesis that OPG might represent a novel actor in the progression of this disease. The overexpression of OPG has been demonstrated during EndMT and linked to autocrine effects characterized by the increased production of ROS. OPG interferes with correct valve endothelial function by increasing proteoglycan and matrix metalloproteases (MMPs) levels [39].

Factors like RANKL, RANK, and OPG are involved in the process of atherosclerosis by altering lipid metabolism. High Density Lipoproteins (HDL) subclasses may be indirect players in the process of the atherosclerotic plaque through the regulation of the expression of genes that encode pro- and anti-calcifying proteins. Data suggest that HDLs protect against the progression of atheroma through mechanisms involving the regulation of genes. In this context, the role of the superfamily of TNF receptors is suggested, and a member of this family—such as OPG—is suggested. In vitro, the incubation of myofibroblasts with HDL for 24 and 48 h resulted in a time-dependent increase in OPG secretion [40].

Concerning the glucose metabolism, the uptake of extracellular glucose is regulated by the transmembrane glucose gradient and the activity of glucose transporters in the plasma membrane. Insulin leads to the relocation of glucose transporters to the plasma membrane with a subsequent increase in capacity for glucose transport. Once in the cell, free glucose is rapidly phosphorylated by hexokinase to form glucose-6-phosphate (G6P). G6P is used for glycogen synthesis or may undergo glycolysis to pyruvate. As we reported, FAs are the preferred substrate for the myocardium; however, during ischemia, glucose becomes the primary source of energy for the myocardium. Its metabolism avoids the toxic end-products such as oxygen free radicals (OFR). Patients with diabetes mellitus have impaired uptake of glucose. In diabetic situations, ECs cannot switch the excess glucose, and glycolytic intermediates drift to side pathways, overall increasing oxidative stress. OFR, such as superoxide, react with nitric oxide (NO) to yield peroxynitrite [41,42].

The growth factor system exerts various effects (on glucose metabolism in particular) in cells of the vasculature through both endocrine and autocrine/paracrine mechanisms. The growth factor system, which includes VEGFs and platelet-derived growth factor (PDGF), a basic fibroblast growth factor, is a key regulator of EC permeability and metabolism. VEGFs and PDGF influence human EC metabolism via Ca^{2+} signaling mechanisms. Mechanisms underlying the endothelial actions of these factors are multiple, and they have been shown to participate in the initiation and development of atherosclerosis. In vascular cells, PDGF upregulates OPG expression [43].

Statins have an impact on endothelial function by preventing oxidized LDL-induced reduction of NO production and increased NO synthesis. Statins also diminish chronic inflammation by reducing PDGF responsiveness and inhibiting not only smooth muscle cell proliferation but also monocyte chemotaxis and migration [44].

4. OPG/RANKL/RANK and Vascular Signaling

The location of vascular ECs links them to various types of mechanical forces—hydrostatic pressure, wall tension, and shear stress. Shear stress regulates cellular functions and gene expression, thus showing the involvement of potential sensors and effectors. Intermediate responses to shear include transcriptional activation of NF-κB target genes [45,46]. To our knowledge, nothing is known about the specific effect of shear stress on the expression of OPG in vascular endothelium. In contrast, it has been reported that shear stress upregulated OPG expression in osteocytes, downregulated the effect of IL-17A on RANKL and TNF-α expression, and attenuated IL-17A-activated osteoclastic differentiation [47].

With advancing age, the phenotype of VSMC and EC changes. Various stimuli promote the development of advanced atherosclerotic lesions. The renin-angiotensin system (RAS) plays a central role in the pathogenesis of vascular alterations and atherosclerosis in the elderly. RAS and its primary mediator, angiotensin-II (Ang II), have a direct influence on the progression of the atherosclerotic process via effects on endothelial function and inflammatory processes. Therapies that block Ang II receptor type 1 induce vascular protection and thus reduce the incidence of cardiovascular events [48]. The stimulation of Ang II has been reported to increase the expression of VEGFs through the activation of Ang II receptor type 1. Members of VEGF family, VEGF-A and VEGF-B, are involved in vascular inflammation and remodeling through increased proinflammatory and angiogenic mechanisms. It was demonstrated that OPG enhanced the proangiogenic effect of VEGFs. Additionally, OPG protects EC from apoptosis induced by growth factor withdrawal [49].

In a recent study, atheroma samples obtained from patients undergoing carotid endarterectomy were cultured with and without an Ang II type 1 receptor (ATR1) antagonist, irbesartan. Irbesartan reduced concentrations of cytokines, IL-6, IL-8, and OPG in both atheroma and primary vascular cell culture supernatants. In these experimental conditions, which used human dermal microvascular ECs, ATR1 blockade with irbesartan also led to a decrease in the expression of extracellular signal regulated kinases, ERK1 and ERK2. Similarly, a more recent study in mice showed that RANKL-induced ERK1/2 phosphorylation was suppressed by another ATR1 inhibitor, Losartan, suggesting a convergence of

RANKL and angiotensin signaling at the level of ERK1/2 regulation [50,51]. OPG activates ERK 1/2, which has been linked to angiogenesis.

5. OPG/RANKL/RANK and Regulation of Angiogenesis

It is now accepted that RANK and its ligand RANKL are involved in endothelial physiology. The RANKL/RANK system plays an active role in pathological angiogenesis and inflammation in addition to its role in cell survival. Growth factors can act on specific cell surface receptors that are then able to transmit their growth signals to other intracellular components and modify gene expression. One example of a protein growth factor with specific properties on EC is VEGF. VEGF up-regulates the expression of RANK and increases angiogenic responses of ECs to RANKL. Moreover, blocking PI3-kinase reversed the RANKL-induced survival effect on ECs [52]. RANK, in response to the paracrine stimulus of RANKL, may play an important role in maintaining EC integrity through the PI3-kinase/Akt signal transduction pathway. In the endothelium, PI3-kinase/Akt signaling is triggered by VEGF and hormones such as insulin [53]. Findings suggest that OPG regulates at least two distinct pathways—one that induces cell proliferation via ERK signaling and another that induces angiogenesis via Src signaling [54]. Bone is a highly vascularized tissue reliant on the close spatial and temporal connection between blood vessels and bone cells to maintain skeletal integrity. An intricate connection between osteogenesis and angiogenesis exists. Decreasing activity of osteoblasts leads to osteoporosis, and crosstalk between osteogenesis and angiogenesis has been shown to play a vital role in bone regeneration [55,56]. Accumulating evidence supports the role of exosomes secreted EPCs in stimulating angiogenesis, which is closely coupled with osteogenesis [57]. Taken together, these results suggest that RANK is important for the maintenance of endothelial integrity in association with metabolic adaptations.

6. OPG/RANKL/RANK and Inflammation

Numerous studies support the role of OPG in promoting inflammation. In the pro-atherosclerotic apolipoprotein knock-out mouse, it was demonstrated that a deficiency of OPG was associated with increased development of atherosclerosis [58]. In vitro studies confirmed that OPG plays an important role in inflammatory cell chemotaxis. As previously stated, OPG stimulates changes in vascular smooth muscle cells and endothelium, which are usually reported in atherosclerosis, by promoting apoptosis and matrix metalloproteinase release. RANKL significantly increases the activity of MMPs in VSMCs. OPG neutralizes the effect of RANKL on the induction of MMP activity in VSMCs by inhibiting its binding to RANK [59,60]. One of the key steps during inflammation is leukocyte infiltration, which, for neutrophils and monocytes, is controlled chiefly by chemokines. The production of these chemokines is regulated by iNOS-derived NO [61]. OPG has been proposed as a marker of endothelial dysfunction in relationship with the inflammatory process. OPG induces the expression of intercellular adhesion molecules, such as vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin, on ECs and thereby promotes leukocyte adhesion, an early step in EC dysfunction, thus supporting the pro-atherosclerotic role of OPG. These local actions, which influence the velocity of leukocyte recruitment from the blood to the tissue, contribute to the multifunctional role of various modulators, such as HSPGs in inflammation [62]. The release of OPG is significantly triggered by the culture of ECs with inflammatory cytokines and leads to the expression of EC adhesion molecules, thereby contributing to the transmigration of monocytes and lymphocytes into the intima of the vessel wall [63]. Cytokine production and activation of their receptors induce mechanisms to recruit monocytes and neutrophils. Therefore, blocking pro-inflammatory interleukins is considered a prime target in the management of some diseases. New molecules represent potential therapeutic strategies. Canakinumab and evolocumab, human monoclonal antibodies that target interleukin-1β, have anti-inflammatory effects and have been approved for clinical use in various disorders [64]. Sarilumab and tocilizumab are human monoclonal antibodies against IL-6 receptor-α (IL-6R α) [65]. Activation of IL-6R is protective and regenerative in some types of cells, but IL-6 signaling via the

soluble IL-6R is rather pro-inflammatory. Interestingly, it was recently reported that in human breast cancer cell lines, IL-1β induced OPG secretion, indicating a novel role for OPG as a mediator of inflammation-promoted breast cancer progression. The increased cellular invasion promoted by IL-1β and OPG involves MMP3 induction [66]. (Figure 2).

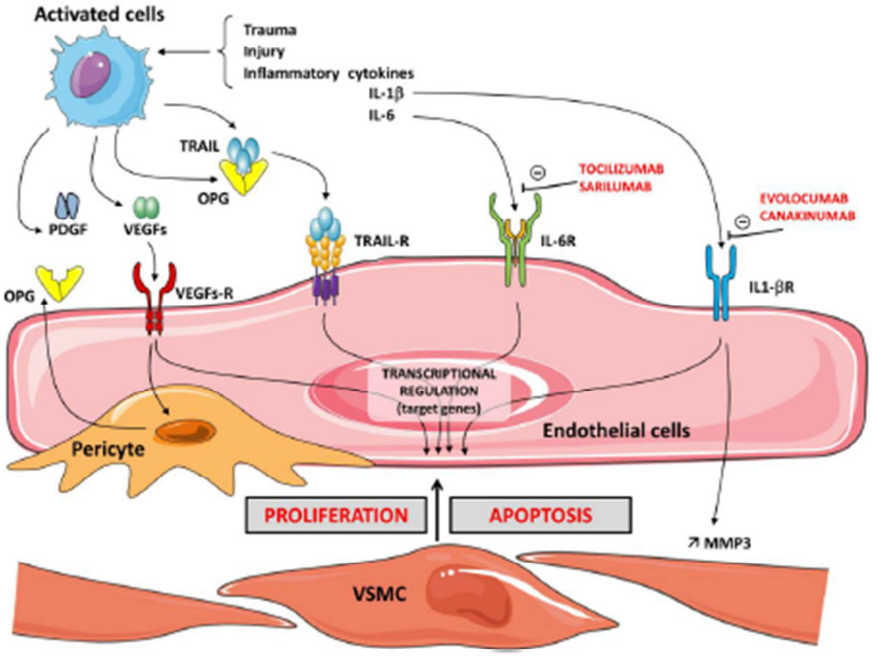


Figure 2. Schema illustrating the relationship between the OPG/TRAIL/TRAIL-R system, pericytes, growth factors, and the cytokines IL-1 and IL-6 on the balance between proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMC). In the presence of inflammatory cytokines IL-1β or IL-6 and trauma or injury, activated cells express OPG. Activation of cytokine receptors IL-1R and IL-6R induces the recruitment of monocytes and neutrophils. The growth factor system, which includes vascular endothelial growth factors (VEGFs) and PDGF, influences the proliferation (angiogenesis) and OPG expression in vascular cells. Associated with the microvasculature, pericytes secrete elevated amounts of OPG. OPG also acts as a receptor for TRAIL. TRAIL binds to its receptors, TRAIL-Rs. The cellular actions of TRAIL are tightly regulated in a balance between the apoptosis and proliferation of vascular cells. TRAIL and RANKL increase matrix metalloproteinase (MMP) activity, leading to degradation of the extracellular matrix. The cellular actions promoted by IL-1β induce MMP-3 production. MMP-3 is constitutively expressed in EC and VSMC. The human monoclonal antibodies canakinumab and evolocumab, which target IL-1β, have anti-inflammatory effects. Sarilumab and tocilizumab are human monoclonal antibodies against the IL-6 receptor-α. Intracellular signaling of IL-6 in response to receptor activation is complex—anti-inflammatory protective but pro-inflammatory for the immune response.

Numerous studies have demonstrated that endothelial and inflammatory cells express RANKL. RANKL significantly increases the activity of MMP in VSMCs, and OPG neutralizes the effect of RANKL on the induction of MMP activity in VSMCs by inhibiting its binding to RANK [60]. Interestingly, in ECs, a relationship has been demonstrated between oxidative stress and RANKL. Incubation of ECs with oxidized low density lipoprotein (OxLDL) and other pro-oxidant molecules, such as H_2O_2, increased RANKL in a dose-dependent manner. Thus, oxidative stress-regulated RANKL expression appears to be a general phenomenon [67]. The observation that OxLDL stimulated

RANKL expression in different vascular cell types revealed one of the processes whereby vascular alterations occurred in patients with an elevated OxLDL level [68]. RANKL was recently demonstrated to potently activate human neutrophil degranulation via the binding to its transmembrane receptor RANK, and RANKL was also shown to be protective against post-ischemic inflammation. Anti-RANKL IgG was shown to exert a potential direct effect on the activation of cardioprotective RISK and SAFE intracellular pathways [69,70]. In the presence of fibroblast growth factors (FGFs), such as FGF21, the expression levels of proteins, including RANKL, were down-regulated, whereas the expression of OPG increased. FGF21 was reported to play a protective role against oxidative stress-related endothelial damage, atherosclerotic plaque formation, and ischemic injury of cardiomyocytes [71,72]. Adaptive immunity appears crucial for endothelial functions. There is growing evidence that innate and adaptive immunity are critical for the properties of the endothelium. In this field, growth differentiation factor 11 (GDF11), a secreted member of the transforming growth factor beta (TGF-β) superfamily, contributes to the regulation of angiogenesis [73–75].

Concerning adaptive immunity, it has been reported that following administration of GDF11, changes in cardiomyocytes are associated with activation of SMAD2, the ubiquitin-proteasome pathway [76]. Finally, it is difficult to overstate the importance of the RANKL–RANK–OPG system with respect to understanding how the TGF-superfamily is controlled.

7. OPG/RANKL/RANK and the Proteasome

Alterations in the ubiquitin-proteasome system (UPS) contribute to the pathogenesis of several diseases, including cancer, neurodegenerative and immune diseases, and atherosclerosis in association with processes of endothelial dysfunction. In vascular cells, a fundamental role has been assigned to the interaction between the UPS and the oxidative stress response. Several data concern the participation of the UPS in the regulation of eNOS expression and activity [77]. The UPS is also an important molecular mechanism involved in regulating vascular and EC aging [78]. Increased ubiquitin staining and reduced proteasome activities have been described in the pathogenesis of congestive heart failure. Several mechanisms are involved in the decline of proteasome activities in these pathological hearts [79]. Interestingly, in experimental models of heart failure, significantly increased mRNA expression of OPG was noted in both the ischemic and non-ischemic myocardium compared with that in subjects without heart failure, suggesting a potential role of OPG in the adaptation of the myocardium to the failure. The OPG/RANK/RANKL axis appears to be activated within the myocardium in the rat model of post-infarction heart failure, implying a potential role for the RANKL/RANK interaction in the pathogenesis of this cardiac disease [80,81]. Therefore, the proteasome pathway in relationship with the OPG/RANK/RANKL axis may represent an effective therapeutic target for the prevention and treatment of cardiac diseases.

8. OPG/RANKL/RANK and Cellular Senescence

Aging-related endothelial dysfunction involves increased oxidative stress, the activation of inflammatory pathways, and impaired regeneration of ECs. Multiple mechanisms responsible for cellular senescence have been proposed, among which the shortening of telomeres associated with the increased oxidative stress appears to be the most important [82]. It is now recognized that OPG participates in protection against atherosclerosis and vascular calcification. There is good evidence to suggest that OPG is involved in cell survival and proliferation [83]. Recent results demonstrate that irradiation-induced senescent tumor cells influence the tumor microenvironment by increasing the production of cytokines, such as OPG. OPG is also considered a survival factor for tumor cells by inhibiting tumor cell apoptosis [84]. OPG is able to induce the activation of the angiogenic signaling pathways in ECs. In addition, OPG has pro-inflammatory effects that could be mediated by the activation of the NF-κB pathway and expression of specific genes [85].

9. OPG/RANKL/RANK and Vascular Calcification

Arterial calcification results from a highly regulated process that shares many similarities with bone formation. The nature of the cells responsible for the formation of arterial calcification is not precisely known. The development of vascular calcification is an active and complex process linked with a multitude of signaling pathways [86]. SMC have been shown to have osteochondrogenic potential. However, recent evidence suggests that various vascular cells—and particularly the pericytes—play a role in this process. Resident vascular pericytes may have a protective effect against the development of vascular calcification. They participate in association with other cells such as monocytes/macrophages in regulating the balance of mineral formation [87].

Moreover, higher pericyte cell density was noted in asymptomatic lesions, suggesting that pericytes could be actively involved in plaque stability. It has been suggested that exposure to inflammatory atherosclerotic stress induces pericytes. Pericytes could be involved in the onset of the mineralized structure in plaques and in the secretion of OPG. Human pericytes secrete elevated amounts of OPG in comparison to SMCs and ECs [88,89]. One of the key functions of pericytes in both skeletal and cardiac muscle is in the modulation of angiogenesis through the promotion of EC survival and migration. Recent evidence suggests that in response to injury, pericytes are also able to modulate local tissue immune responses via several independent pathways. In this area, the OPG/RANK/RANKL axis in association with the functions of pericytes may be involved in vasculogenesis. OPG-mediated angiogenesis involves the MAPK and Akt signaling pathways [90,91]. The ability of pericytes to enhance myocardial repair has been demonstrated. However, the underlying mechanisms are less clear than those in skeletal muscle [92]. Injured hearts into which pericytes were transplanted exhibited significant attenuation of the post-injury decline in cardiac pump function. These effects are associated with decreased inflammation and increased angiogenesis [93]. OPG appears to afford protection against vascular calcification since OPG−/− mice developed spontaneous arterial calcification, and depleting OPG in ApoE-/- mice increased atherosclerotic lesion progression and calcification [94]. Concerning the incidence of RANK/RANKL on vascular calcification, these factors have roles in both promoting and inhibiting this process. There are many factors impacting vascular calcification, which is a complex process in relation to an early stage of chronic kidney disease (CKD). It is recognized that RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification by binding to RANK and increasing BMP4 production through activation of the alternative NF-κB pathway [95]. As RANKL is thought to promote vascular muscle cell calcification, RANKL inhibition by specific agents, such as denosumab, have been tested for their ability to prevent vascular calcification [96].

As we previously reported, RANKL, RANK, and OPG are involved in the process of atherosclerosis by altering lipid metabolism. HDLs protect against the progression of atheroma through mechanisms involving the regulation of production of pro and anti-calcifying proteins. A correlation between the calcium score and phospholipids of HDL subclasses was described. Coronary artery calcification scores and lipid profiles are independent aspects of atherosclerosis, and only lipids may be biomarkers of coronary calcification during the asymptomatic stages of the disease [97].

Vascular calcification is an active cell-mediated process, and like osteogenesis, it involves the expression of bone-related proteins, such as alkaline phosphatase (ALP) and Runt-related transcription factor-2 (Runx2), which are initiators of bone mineralization and SMC differentiation. Calcified atherosclerotic lesions have been shown to express ALP [98]. Otherwise, high ALP levels are associated with an increased risk of cardiovascular events and mortality in patients. This link between ALP and the coronary artery calcium score is subject to several confounding factors, such as Glomerular Filtration Rate (GFR), an inflammatory status with mediators acting on endothelial function. It is now well-recognized that OPG is significantly associated with endothelial function and predicts early carotid atherosclerosis in patients with coronary artery disease (CAD). The carotid intima-media thickness (CIMT) is correlated with carotid atherosclerosis and is a significant predictor of cardiovascular events. The OPG levels are associated with the CIMT in CAD patients [99,100]. OPG has been proposed as a marker of endothelial dysfunction of early pathophysiological events. Among the tested

12 inflammatory markers, only the OPG had significant prognostic value in predicting the occurrence of atrial fibrillation (AF). The levels of OPG were significantly associated with incident AF [101,102].

In conclusion, it is evident that impaired bone metabolism has an important role in the development of vascular calcification. Bones and vessels have mutual changes in mineralization; this situation is called "the bone-vascular axis" and is associated with coronary diseases [103].

10. Summary

The existence of crosstalk between ECs and osteoblasts during osteogenesis was demonstrated, thus establishing a link between angiogenesis and osteogenesis. A relationship concerning bone regulatory proteins and vascular biology was proposed, and it was established that OPG mediates vascular calcification. The RANKL/RANK system plays an effective role in cell survival under normal and pathological conditions, angiogenesis and inflammation. A great effort was made to determine the mechanism of interaction between RANKL and OPG and the initiation of diseases. The manipulation of the OPG/RANKL ratio is the basis for developing new therapeutics.

New data showed the potency of innovative peptides as inhibitors of RANKL, and results provided useful information for the development of various therapeutics. Previously, we reported that RANKL inhibition by specific agents such as denosumab were tested for their ability to prevent vascular calcification [96]. Evidence suggests that inhibition of RANKL does not only induce an increase in bone mass and vascular calcification but also has anti-tumor effects [104]. RANKL and RANK are expressed on cells of the immune system—in particular, B cells and activated T lymphocytes. The expression of RANKL in cells of the immune system contributes to the pathogenesis of several autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis. In vitro, a Jak1/2 inhibitor, baricitinib, inhibits osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression in osteoblasts [105]. While the role of the RANKL/RANK/OPG axis in bone remodeling has been greatly studied, the role of this triad in the central nervous system has only begun to arise. RANKL mRNA and RANK/RANKL expression are localized to the brain. Thus, the OPG/RANKL/RANK axis appears to play a role in controlling the central febrile response and inflammation in ischemic brain [69].

Concerning the potential clinical properties of TRAIL, the context is contradictory. Unlike serum levels of OPG, those of TRAIL are significantly lower in patients affected by or predisposed to CVD. Potentially, TRAIL is a "janus" molecule with two faces, the first able to induce apoptosis and stimulate inflammation and the second likely to promote cell survival and inhibit inflammation. These opposing effects depend on its concentration. The specific localization of the TRAIL receptor complex may be another mechanism involved in the TRAIL-induced anti-apoptotic signaling events. It was suggested that it would be useful to develop novel formulations to increase the circulatory half-life of TRAIL with the aim to improve the beneficial actions attributed to TRAIL in various therapies. Another future clinical direction concerns the genomic analysis of certain proteins related to the inflammatory process and OPG signaling. For example, Ecto-5′-nucleotidase/CD73/NT5E, the product of the NT5E gene, is the dominant enzyme in the generation of adenosine from the degradation of ATP. As we previously reported, in a human osteoprogenitor cell line in vitro, it has been shown that adenosine and adenosine receptor agonists inhibited OPG secretion [31]. CD73 is found in a variety of tissues including endothelium. The endothelial CD73 axis regulates hemostasis by converting the local environment from a prothrombotic ATP/ADP-rich state to an antithrombotic, adenosine-rich environment. Mutations in NT5E, which codes for Ecto-5′-nucleotidase (CD73), result in calcifications of the lower-extremity arteries in patients with a syndrome called CALJA (calcification of joints and arteries) [106]. Recent studies suggest that active processes contributing to vascular calcification are compensated by calcification inhibitors. Genetic or pharmacological interventions interfering with CD73 activity may prove useful in various diseases [107]. CD73 inhibitors such as adenosine 5′-α,β-methylene-diphosphate present promising potential as a therapeutic target [108]. Pharmacogenomics is an area where genomic discoveries are able to improve clinical care.

Author Contributions: All authors participated in the research and writing of the review.

Funding: This work was supported by grants from French Ministry of Research, INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) and, from the Regional Council of Burgundy (Conseil Régional de Bourgogne), FEDER and Association de Cardiologie de Bourgogne. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

Acknowledgments: The authors wish to thank Philip Bastable for English assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AA	Amino acid
ALP	Alkaline phosphatase
Ang	Angiotensin
AP-1	Activator protein-1
ASCs	Adipose-stromal cells
CAD	Coronary artery disease
CIMT	Carotid intima-media thickness
CKD	Chronic kidney disease
CVD	Cardiovascular disease;
DR	Death receptors;
EC	Endothelial cell;
ECFC	Endothelial colony-forming cell;
EndMT	Endothelial to mesenchymal transition
EPC	Endothelial progenitor cell
FA	Fatty acid
FAO	Fatty acid–beta-oxidation
FGFs	Fibroblast growth factors
GDF-11	Growth differentiation factor-11
GFR	Glomerular Filtration Rate
GLUT	Glucose transporter
HDL	High Density Lipoproteins
HSPGs	Heparan sulfate proteoglycans
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
kD	kiloDalton
MMP	Matrix metalloprotease
Nf-κB	Nuclear factor κB
NO	Nitric oxide
NOS	NO synthetase
NOX	NADPH oxidase
Nrf2	Nuclear factor-E2-related factor 2
OCIF	Osteoclastogenesis inhibitory factor
OPG	Osteoprotegerin
OxLDL	Oxidized low density lipoprotein
PPARs	Peroxisome proliferator-activated receptors
RA	Rheumatoid arthritis
RANK	Receptor activator of nuclear factor κ B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor κ B ligand
ROS	Reactive oxygen species
SMPC	Smooth muscle progenitor cells
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TNFRS	Tumor necrosis factor receptor superfamily
TRAF	TNFR-associated factor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

TSP-1	Thrombospondin-1
VCAM	Vascular adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSMC	Vascular smooth muscle cells
vWF	von Willebrand factor
WPB	Weibel-Palade bodies

References

1. Walsh, M.C.; Choi, Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 511. [CrossRef] [PubMed]
2. Rochette, L.; Meloux, A.; Rigal, E.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. The role of osteoprotegerin in the crosstalk between vessels and bone: Its potential utility as a marker of cardiometabolic diseases. *Pharm. Ther.* **2018**, *182*, 115–132. [CrossRef] [PubMed]
3. Barbu, C.G.; Arsene, A.L.; Florea, S.; Albu, A.; Sirbu, A.; Martin, S.; Nicolae, A.C.; Burcea-Dragomiroiu, G.T.A.; Popa, D.E.; Velescu, B.S.; et al. Cardiovascular risk assessment in osteoporotic patients using osteoprotegerin as a reliable predictive biochemical marker. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 6059–6067. [CrossRef] [PubMed]
4. Harper, E.; Forde, H.; Davenport, C.; Rochfort, K.D.; Smith, D.; Cummins, P.M. Vascular calcification in type-2 diabetes and cardiovascular disease: Integrative roles for OPG, RANKL and TRAIL. *Vasc. Pharm.* **2016**, *82*, 30–40. [CrossRef] [PubMed]
5. Kuroda, Y.; Matsuo, K. Molecular mechanisms of triggering, amplifying and targeting RANK signaling in osteoclasts. *World J. Orthop.* **2012**, *3*, 167–174. [CrossRef] [PubMed]
6. Gyurkovska, V.; Ivanovska, N. Distinct roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in viral and bacterial infections: From pathogenesis to pathogen clearance. *Inflamm. Res.* **2016**, *65*, 427–437. [CrossRef] [PubMed]
7. Forde, H.; Harper, E.; Davenport, C.; Rochfort, K.D.; Wallace, R.; Murphy, R.P.; Smith, D.; Cummins, P.M. The beneficial pleiotropic effects of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) within the vasculature: A review of the evidence. *Atherosclerosis* **2016**, *247*, 87–96. [CrossRef]
8. D'Auria, F.; Centurione, L.; Centurione, M.A.; Angelini, A.; Di Pietro, R. Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (Trail) in endothelial response to biomechanical and biochemical stresses in arteries. *J. Cell. Biochem.* **2015**, *116*, 2427–2434. [CrossRef]
9. Lang, I.; Fullsack, S.; Wyzgol, A.; Fick, A.; Trebing, J.; Arana, J.A.; Schafer, V.; Weisenberger, D.; Wajant, H. Binding Studies of TNF Receptor Superfamily (TNFRSF) Receptors on Intact Cells. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 5022–5037. [CrossRef]
10. Hur, J.; Ghosh, A.; Kim, K.; Ta, H.M.; Kim, H.; Kim, N.; Hwang, H.Y.; Kim, K.K. Design of a RANK-Mimetic Peptide Inhibitor of Osteoclastogenesis with Enhanced RANKL-Binding Affinity. *Mol. Cells* **2016**, *39*, 316–321.
11. Munasinghe, A.; Lin, P.; Colina, C.M. Unraveling Binding Interactions between Human RANKL and Its Decoy Receptor Osteoprotegerin. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 9141–9148. [CrossRef] [PubMed]
12. Simonet, W.S.; Lacey, D.L.; Dunstan, C.R.; Kelley, M.; Chang, M.S.; Luthy, R.; Nguyen, H.Q.; Wooden, S.; Bennett, L.; Boone, T.; et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **1997**, *89*, 309–319. [CrossRef]
13. Schoppet, M.; Henser, S.; Ruppert, V.; Stubig, T.; Al-Fakhri, N.; Maisch, B.; Hofbauer, L.C. Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF-kappaB-dependent. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *100*, 1430–1439. [CrossRef] [PubMed]
14. Cunha, D.A.; Cito, M.; Carlsson, P.O.; Vanderwinden, J.M.; Molkentin, J.D.; Bugliani, M.; Marchetti, P.; Eizirik, D.L.; Cnop, M. Thrombospondin 1 protects pancreatic beta-cells from lipotoxicity via the PERK-NRF2 pathway. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 1995–2006. [CrossRef] [PubMed]
15. Milanova, V.; Ivanovska, N.; Dimitrova, P. TLR2 elicits IL-17-mediated RANKL expression, IL-17, and OPG production in neutrophils from arthritic mice. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 643406. [CrossRef] [PubMed]

16. Lee, G.L.; Yeh, C.C.; Wu, J.Y.; Lin, H.C.; Wang, Y.F.; Kuo, Y.Y.; Hsieh, Y.T.; Hsu, Y.J.; Kuo, C.C. TLR2 Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Chondrogenic Differentiation and Consequent Calcification Via the Concerted Actions of Osteoprotegerin Suppression and IL-6-Mediated RANKL Induction. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**. [CrossRef] [PubMed]
17. Schaalan, M.; Mohamed, W. Predictive ability of circulating osteoprotegerin as a novel biomarker for early detection of acute kidney injury induced by sepsis. *Eur. Cytokine Netw.* **2017**, *28*, 52–62.
18. Kim, J.Y.; Park, Y.J.; Kim, K.J.; Choi, J.J.; Kim, W.U.; Cho, C.S. Osteoprotegerin causes apoptosis of endothelial progenitor cells by induction of oxidative stress. *Arthritis Rheum.* **2013**, *65*, 2172–2182. [CrossRef]
19. Lee, J.; Lee, S.; Lee, C.Y.; Seo, H.H.; Shin, S.; Choi, J.W.; Kim, S.W.; Park, J.C.; Lim, S.; Hwang, K.C. Adipose-derived stem cell-released osteoprotegerin protects cardiomyocytes from reactive oxygen species-induced cell death. *Stem Cell Res.* **2017**, *8*, 195. [CrossRef]
20. Chung, C.P.; Solus, J.F.; Oeser, A.; Li, C.; Raggi, P.; Smith, J.R.; Stein, C.M. A variant in the osteoprotegerin gene is associated with coronary atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis: Results from a candidate gene study. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 3885–3894. [CrossRef]
21. Mishra, P.K.; Givvimani, S.; Chavali, V.; Tyagi, S.C. Cardiac matrix: A clue for future therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1832*, 2271–2276. [CrossRef] [PubMed]
22. Brutsaert, D.L. Cardiac endothelial-myocardial signaling: Its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 59–115. [CrossRef] [PubMed]
23. Eelen, G.; de Zeeuw, P.; Simons, M.; Carmeliet, P. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 1231–1244. [CrossRef] [PubMed]
24. Culic, O.; Gruwel, M.L.; Schrader, J. Energy turnover of vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, C205–C213. [CrossRef] [PubMed]
25. Schoors, S.; Bruning, U.; Missiaen, R.; Queiroz, K.C.; Borgers, G.; Elia, I.; Zecchin, A.; Cantelmo, A.R.; Christen, S.; Goveia, J.; et al. Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells. *Nature* **2015**, *520*, 192–197. [CrossRef] [PubMed]
26. Kolwicz, S.C., Jr.; Purohit, S.; Tian, R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ. Res.* **2013**, *113*, 603–616. [CrossRef] [PubMed]
27. Iso, T.; Maeda, K.; Hanaoka, H.; Suga, T.; Goto, K.; Syamsunarno, M.R.; Hishiki, T.; Nagahata, Y.; Matsui, H.; Arai, M.; et al. Capillary endothelial fatty acid binding proteins 4 and 5 play a critical role in fatty acid uptake in heart and skeletal muscle. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 2549–2557. [CrossRef]
28. Hagberg, C.E.; Falkevall, A.; Wang, X.; Larsson, E.; Huusko, J.; Nilsson, I.; van Meeteren, L.A.; Samen, E.; Lu, L.; Vanwildemeersch, M.; et al. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* **2010**, *464*, 917–921. [CrossRef]
29. Ingwall, J.S. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *81*, 412–419. [CrossRef]
30. Ashrafian, H.; Frenneaux, M.P.; Opie, L.H. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation* **2007**, *116*, 434–448. [CrossRef]
31. Evans, B.A.; Elford, C.; Pexa, A.; Francis, K.; Hughes, A.C.; Deussen, A.; Ham, J. Human osteoblast precursors produce extracellular adenosine, which modulates their secretion of IL-6 and osteoprotegerin. *J. Bone Miner. Res.* **2006**, *21*, 228–236. [CrossRef] [PubMed]
32. Bernardes, M.; Vieira, T.S.; Martins, M.J.; Lucas, R.; Costa, L.; Pereira, J.G.; Ventura, F.; Martins, E. Myocardial Perfusion in Rheumatoid Arthritis Patients: Associations with Traditional Risk Factors and Novel Biomarkers. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 6509754. [CrossRef] [PubMed]
33. Fishman, P.; Cohen, S. The A3 adenosine receptor (A3AR): Therapeutic target and predictive biological marker in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **2016**, *35*, 2359–2362. [CrossRef] [PubMed]
34. Kobayashi-Sakamoto, M.; Hirose, K.; Isogai, E.; Chiba, I. NF-kappaB-dependent induction of osteoprotegerin by Porphyromonas gingivalis in endothelial cells. *BioChem. Biophys. Res. Commun* **2004**, *315*, 107–112. [CrossRef] [PubMed]
35. Kobayashi-Sakamoto, M.; Isogai, E.; Hirose, K.; Chiba, I. Role of alphav integrin in osteoprotegerin-induced endothelial cell migration and proliferation. *Microvasc. Res.* **2008**, *76*, 139–144. [CrossRef] [PubMed]
36. Benslimane-Ahmim, Z.; Poirier, F.; Delomenie, C.; Lokajczyk, A.; Grelac, F.; Galy-Fauroux, I.; Mohamedi, A.; Fischer, A.M.; Heymann, D.; Lutomski, D.; et al. Mechanistic study of the proangiogenic effect of osteoprotegerin. *Angiogenesis* **2013**, *16*, 575–593. [CrossRef] [PubMed]

37. Kumar, A.V.; Katakam, S.K.; Urbanowitz, A.K.; Gotte, M. Heparan sulphate as a regulator of leukocyte recruitment in inflammation. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2015**, *16*, 77–86. [CrossRef]
38. Wylie-Sears, J.; Aikawa, E.; Levine, R.A.; Yang, J.H.; Bischoff, J. Mitral valve endothelial cells with osteogenic differentiation potential. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 598–607. [CrossRef]
39. Songia, P.; Branchetti, E.; Parolari, A.; Myasoedova, V.; Ferrari, G.; Alamanni, F.; Tremoli, E.; Poggio, P. Mitral valve endothelial cells secrete osteoprotegerin during endothelial mesenchymal transition. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2016**, *98*, 48–57. [CrossRef]
40. Lommi, J.I.; Kovanen, P.T.; Jauhiainen, M.; Lee-Rueckert, M.; Kupari, M.; Helske, S. High-density lipoproteins (HDL) are present in stenotic aortic valves and may interfere with the mechanisms of valvular calcification. *Atherosclerosis* **2011**, *219*, 538–544. [CrossRef]
41. Rochette, L.; Lorin, J.; Zeller, M.; Guilland, J.C.; Lorgis, L.; Cottin, Y.; Vergely, C. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharm. Ther.* **2013**, *140*, 239–257. [CrossRef] [PubMed]
42. Rochette, L.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 2709–2729. [CrossRef] [PubMed]
43. Zhang, J.; Fu, M.; Myles, D.; Zhu, X.; Du, J.; Cao, X.; Chen, Y.E. PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways. *FEBS Lett.* **2002**, *521*, 180–184. [CrossRef]
44. Kleemann, R.; Bureeva, S.; Perlina, A.; Kaput, J.; Verschuren, L.; Wielinga, P.Y.; Hurt-Camejo, E.; Nikolsky, Y.; van Ommen, B.; Kooistra, T. A systems biology strategy for predicting similarities and differences of drug effects: Evidence for drug-specific modulation of inflammation in atherosclerosis. *BMC Syst. Biol.* **2011**, *5*, 125. [CrossRef] [PubMed]
45. Orr, A.W.; Sanders, J.M.; Bevard, M.; Coleman, E.; Sarembock, I.J.; Schwartz, M.A. The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kappaB activation by flow: A potential role in atherosclerosis. *J. Cell Biol.* **2005**, *169*, 191–202. [CrossRef] [PubMed]
46. Givens, C.; Tzima, E. Endothelial Mechanosignaling: Does One Sensor Fit All? *Antioxid. Redox Signal.* **2016**, *25*, 373–388. [CrossRef] [PubMed]
47. Liao, C.; Cheng, T.; Wang, S.; Zhang, C.; Jin, L.; Yang, Y. Shear stress inhibits IL-17A-mediated induction of osteoclastogenesis via osteocyte pathways. *Bone* **2017**, *101*, 10–20. [CrossRef]
48. Husain, K.; Hernandez, W.; Ansari, R.A.; Ferder, L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J. Biol. Chem.* **2015**, *6*, 209–217. [CrossRef]
49. Malyankar, U.M.; Scatena, M.; Suchland, K.L.; Yun, T.J.; Clark, E.A.; Giachelli, C.M. Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20959–20962. [CrossRef]
50. Clancy, P.; Koblar, S.A.; Golledge, J. Angiotensin receptor 1 blockade reduces secretion of inflammation associated cytokines from cultured human carotid atheroma and vascular cells in association with reduced extracellular signal regulated kinase expression and activation. *Atherosclerosis* **2014**, *236*, 108–115. [CrossRef]
51. Chen, S.; Grover, M.; Sibai, T.; Black, J.; Rianon, N.; Rajagopal, A.; Munivez, E.; Bertin, T.; Dawson, B.; Chen, Y.; et al. Losartan increases bone mass and accelerates chondrocyte hypertrophy in developing skeleton. *Mol. Genet. Metab.* **2015**, *115*, 53–60. [CrossRef] [PubMed]
52. Min, J.K.; Kim, Y.M.; Kim, Y.M.; Kim, E.C.; Gho, Y.S.; Kang, I.J.; Lee, S.Y.; Kong, Y.Y.; Kwon, Y.G. Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF-kappa B (RANK) in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39548–39557. [CrossRef] [PubMed]
53. Potente, M.; Carmeliet, P. The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, *79*, 43–66. [CrossRef] [PubMed]
54. Kobayashi-Sakamoto, M.; Isogai, E.; Holen, I. Osteoprotegerin induces cytoskeletal reorganization and activates FAK, Src, and ERK signaling in endothelial cells. *Eur. J. Haematol.* **2010**, *85*, 26–35. [CrossRef] [PubMed]
55. Kusumbe, A.P.; Ramasamy, S.K.; Adams, R.H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* **2014**, *507*, 323–328. [CrossRef] [PubMed]
56. Veeriah, V.; Paone, R.; Chatterjee, S.; Teti, A.; Capulli, M. Osteoblasts Regulate Angiogenesis in Response to Mechanical Unloading. *Calcif. Tissue Int.* **2018**. [CrossRef] [PubMed]

57. Jia, Y.; Zhu, Y.; Qiu, S.; Xu, J.; Chai, Y. Exosomes secreted by endothelial progenitor cells accelerate bone regeneration during distraction osteogenesis by stimulating angiogenesis. *Stem Cell Res.* **2019**, *10*, 12. [CrossRef] [PubMed]
58. Bennett, B.J.; Scatena, M.; Kirk, E.A.; Rattazzi, M.; Varon, R.M.; Averill, M.; Schwartz, S.M.; Giachelli, C.M.; Rosenfeld, M.E. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE-/- mice. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 2117–2124. [CrossRef]
59. Moran, C.S.; McCann, M.; Karan, M.; Norman, P.; Ketheesan, N.; Golledge, J. Association of osteoprotegerin with human abdominal aortic aneurysm progression. *Circulation* **2005**, *111*, 3119–3125. [CrossRef]
60. Quercioli, A.; Mach, F.; Bertolotto, M.; Lenglet, S.; Vuilleumier, N.; Galan, K.; Pagano, S.; Braunersreuther, V.; Pelli, G.; Pistoia, V.; et al. Receptor activator of NF- kappaB ligand (RANKL) increases the release of neutrophil products associated with coronary vulnerability. *Thromb. Haemost.* **2012**, *107*, 124–139.
61. Kobayashi, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **2010**, *88*, 1157–1162. [CrossRef] [PubMed]
62. Zauli, G.; Corallini, F.; Bossi, F.; Fischetti, F.; Durigutto, P.; Celeghini, C.; Tedesco, F.; Secchiero, P. Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood* **2007**, *110*, 536–543. [CrossRef] [PubMed]
63. Mangan, S.H.; Van Campenhout, A.; Rush, C.; Golledge, J. Osteoprotegerin upregulates endothelial cell adhesion molecule response to tumor necrosis factor-alpha associated with induction of angiopoietin-2. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *76*, 494–505. [CrossRef] [PubMed]
64. Peiro, C.; Lorenzo, O.; Carraro, R.; Sanchez-Ferrer, C.F. IL-1beta Inhibition in Cardiovascular Complications Associated to Diabetes Mellitus. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 363. [CrossRef] [PubMed]
65. Lee, E.B. A review of sarilumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Immunotherapy* **2018**, *10*, 57–65. [CrossRef] [PubMed]
66. Chung, S.T.; Geerts, D.; Roseman, K.; Renaud, A.; Connelly, L. Osteoprotegerin mediates tumor-promoting effects of Interleukin-1beta in breast cancer cells. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 27. [CrossRef]
67. Maziere, C.; Salle, V.; Gomila, C.; Maziere, J.C. Oxidized low density lipoprotein increases RANKL level in human vascular cells. Involvement of oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2013**, *440*, 295–299. [CrossRef]
68. Holvoet, P.; Jenny, N.S.; Schreiner, P.J.; Tracy, R.P.; Jacobs, D.R.; Multi-Ethnic Study of, A. The relationship between oxidized LDL and other cardiovascular risk factors and subclinical CVD in different ethnic groups: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* **2007**, *194*, 245–252. [CrossRef]
69. Shimamura, M.; Nakagami, H.; Osako, M.K.; Kurinami, H.; Koriyama, H.; Zhengda, P.; Tomioka, H.; Tenma, A.; Wakayama, K.; Morishita, R. OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 8191–8196. [CrossRef]
70. Heusch, G. Molecular basis of cardioprotection: Signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 674–699. [CrossRef]
71. Domouzoglou, E.M.; Naka, K.K.; Vlahos, A.P.; Papafaklis, M.I.; Michalis, L.K.; Tsatsoulis, A.; Maratos-Flier, E. Fibroblast growth factors in cardiovascular disease: The emerging role of FGF21. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2015**, *309*, H1029–H1038. [CrossRef] [PubMed]
72. Cao, F.; Wang, S.; Cao, X.; Liu, X.; Fu, K.; Hao, P.; Liu, J. Fibroblast growth factor 21 attenuates calcification of vascular smooth muscle cells in vitro. *J. Pharm. Pharm.* **2017**, *69*, 1802–1816. [CrossRef] [PubMed]
73. Katsimpardi, L.; Litterman, N.K.; Schein, P.A.; Miller, C.M.; Loffredo, F.S.; Wojtkiewicz, G.R.; Chen, J.W.; Lee, R.T.; Wagers, A.J.; Rubin, L.L. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science* **2014**, *344*, 630–634. [CrossRef]
74. Rochette, L.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. Growth and differentiation factor 11 (GDF11): Functions in the regulation of erythropoiesis and cardiac regeneration. *Pharm. Ther.* **2015**, *156*, 26–33. [CrossRef] [PubMed]
75. Liu, W.; Zhou, L.; Zhou, C.; Zhang, S.; Jing, J.; Xie, L.; Sun, N.; Duan, X.; Jing, W.; Liang, X.; et al. GDF11 decreases bone mass by stimulating osteoclastogenesis and inhibiting osteoblast differentiation. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12794. [CrossRef] [PubMed]
76. Zimmers, T.A.; Jiang, Y.; Wang, M.; Liang, T.W.; Rupert, J.E.; Au, E.D.; Marino, F.E.; Couch, M.E.; Koniaris, L.G. Exogenous GDF11 induces cardiac and skeletal muscle dysfunction and wasting. *Basic Res. Cardiol.* **2017**, *112*, 48. [CrossRef] [PubMed]

77. Stangl, K.; Stangl, V. The ubiquitin-proteasome pathway and endothelial (dys)function. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *85*, 281–290. [CrossRef]
78. Laina, A.; Stellos, K.; Stamatelopoulos, K. Vascular ageing: Underlying mechanisms and clinical implications. *Exp. Gerontol.* **2018**, *109*, 16–30. [CrossRef]
79. Depre, C.; Wang, Q.; Yan, L.; Hedhli, N.; Peter, P.; Chen, L.; Hong, C.; Hittinger, L.; Ghaleb, B.; Sadoshima, J.; et al. Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy. *Circulation* **2006**, *114*, 1821–1828. [CrossRef]
80. Ueland, T.; Yndestad, A.; Oie, E.; Florholmen, G.; Halvorsen, B.; Froland, S.S.; Simonsen, S.; Christensen, G.; Gullestad, L.; Aukrust, P. Dysregulated osteoprotegerin/RANK ligand/RANK axis in clinical and experimental heart failure. *Circulation* **2005**, *111*, 2461–2468. [CrossRef]
81. Di Giuseppe, R.; Biemann, R.; Wirth, J.; Menzel, J.; Isermann, B.; Stangl, G.I.; Fritsche, A.; Boeing, H.; Schulze, M.B.; Weikert, C. Plasma osteoprotegerin, its correlates, and risk of heart failure: A prospective cohort study. *Eur. J. Epidemiol.* **2017**, *32*, 113–123. [CrossRef] [PubMed]
82. Saliques, S.; Teyssier, J.R.; Vergely, C.; Lorgis, L.; Lorin, J.; Donzel, A.; Sicard, P.; Berchoud, J.; Ragot, S.; Touzery, C.; et al. Smoking and FOS expression from blood leukocyte transcripts in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* **2011**, *219*, 931–936. [CrossRef] [PubMed]
83. Dougall, W.C. Molecular pathways: Osteoclast-dependent and osteoclast-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 326–335. [CrossRef] [PubMed]
84. Hwang, H.J.; Jung, S.H.; Lee, H.C.; Han, N.K.; Bae, I.H.; Lee, M.; Han, Y.H.; Kang, Y.S.; Lee, S.J.; Park, H.J.; et al. Identification of novel therapeutic targets in the secretome of ionizing radiationinduced senescent tumor cells. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 841–850. [CrossRef] [PubMed]
85. Pietschmann, P.; Mechtcheriakova, D.; Meshcheryakova, A.; Foger-Samwald, U.; Ellinger, I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology* **2016**, *62*, 128–137. [CrossRef] [PubMed]
86. Bartoli-Leonard, F.; Wilkinson, F.L.; Langford-Smith, A.W.W.; Alexander, M.Y.; Weston, R. The Interplay of SIRT1 and Wnt Signaling in Vascular Calcification. *Front. Cardiovasc. Med.* **2018**, *5*, 183. [CrossRef] [PubMed]
87. Davaine, J.M.; Quillard, T.; Brion, R.; Laperine, O.; Guyomarch, B.; Merlini, T.; Chatelais, M.; Guilbaud, F.; Brennan, M.A.; Charrier, C.; et al. Osteoprotegerin, pericytes and bone-like vascular calcification are associated with carotid plaque stability. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107642. [CrossRef] [PubMed]
88. Navarro, R.; Compte, M.; Alvarez-Vallina, L.; Sanz, L. Immune Regulation by Pericytes: Modulating Innate and Adaptive Immunity. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 480. [CrossRef]
89. Hung, C.F.; Mittelsteadt, K.L.; Brauer, R.; McKinney, B.L.; Hallstrand, T.S.; Parks, W.C.; Chen, P.; Schnapp, L.M.; Liles, W.C.; Duffield, J.S.; et al. Lung pericyte-like cells are functional interstitial immune sentinel cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2017**, *312*, L556–L567. [CrossRef]
90. Benslimane-Ahmim, Z.; Heymann, D.; Dizier, B.; Lokajczyk, A.; Brion, R.; Laurendeau, I.; Bieche, I.; Smadja, D.M.; Galy-Fauroux, I.; Colliec-Jouault, S.; et al. Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2011**, *9*, 834–843. [CrossRef]
91. Abu El-Asrar, A.M.; Struyf, S.; Mohammad, G.; Gouwy, M.; Rytinx, P.; Siddiquei, M.M.; Hernandez, C.; Alam, K.; Mousa, A.; De Hertogh, G.; et al. Osteoprotegerin Is a New Regulator of Inflammation and Angiogenesis in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2017**, *58*, 3189–3201. [CrossRef] [PubMed]
92. Murray, I.R.; Baily, J.E.; Chen, W.C.W.; Dar, A.; Gonzalez, Z.N.; Jensen, A.R.; Petrigliano, F.A.; Deb, A.; Henderson, N.C. Skeletal and cardiac muscle pericytes: Functions and therapeutic potential. *Pharm.* **2017**, *171*, 65–74. [CrossRef] [PubMed]
93. Chen, C.W.; Okada, M.; Proto, J.D.; Gao, X.; Sekiya, N.; Beckman, S.A.; Corselli, M.; Crisan, M.; Saparov, A.; Tobita, K.; et al. Human pericytes for ischemic heart repair. *Stem Cells* **2013**, *31*, 305–316. [CrossRef] [PubMed]
94. Wu, M.; Rementer, C.; Giachelli, C.M. Vascular calcification: An update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif. Tissue Int.* **2013**, *93*, 365–373. [CrossRef] [PubMed]
95. Schneeweis, L.A.; Willard, D.; Milla, M.E. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 41155–41164. [CrossRef] [PubMed]
96. Panizo, S.; Cardus, A.; Encinas, M.; Parisi, E.; Valcheva, P.; Lopez-Ongil, S.; Coll, B.; Fernandez, E.; Valdivielso, J.M. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ. Res.* **2009**, *104*, 1041–1048. [CrossRef] [PubMed]

97. Garcia-Sanchez, C.; Posadas-Romero, C.; Posadas-Sanchez, R.; Carreon-Torres, E.; Rodriguez-Perez, J.M.; Juarez-Rojas, J.G.; Martinez-Sanchez, C.; Fragoso, J.M.; Gonzalez-Pacheco, H.; Vargas-Alarcon, G.; et al. Low concentrations of phospholipids and plasma HDL cholesterol subclasses in asymptomatic subjects with high coronary calcium scores. *Atherosclerosis* **2015**, *238*, 250–255. [CrossRef] [PubMed]
98. Shioi, A.; Katagi, M.; Okuno, Y.; Mori, K.; Jono, S.; Koyama, H.; Nishizawa, Y. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: Roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circ. Res.* **2002**, *91*, 9–16. [CrossRef] [PubMed]
99. Morisawa, T.; Nakagomi, A.; Kohashi, K.; Kosugi, M.; Kusama, Y.; Atarashi, H.; Shimizu, W. Osteoprotegerin is Associated with Endothelial Function and Predicts Early Carotid Atherosclerosis in Patients With Coronary Artery Disease. *Int. Heart J.* **2015**, *56*, 605–612. [CrossRef]
100. Panh, L.; Ruidavets, J.B.; Rousseau, H.; Petermann, A.; Bongard, V.; Berard, E.; Taraszkiewicz, D.; Lairez, O.; Galinier, M.; Carrie, D.; et al. Association between serum alkaline phosphatase and coronary artery calcification in a sample of primary cardiovascular prevention patients. *Atherosclerosis* **2017**, *260*, 81–86. [CrossRef]
101. Schnabel, R.B.; Larson, M.G.; Yamamoto, J.F.; Kathiresan, S.; Rong, J.; Levy, D.; Keaney, J.F., Jr.; Wang, T.J.; Vasan, R.S.; Benjamin, E.J. Relation of multiple inflammatory biomarkers to incident atrial fibrillation. *Am. J. Cardiol.* **2009**, *104*, 92–96. [CrossRef] [PubMed]
102. Willeit, K.; Pechlaner, R.; Willeit, P.; Skroblin, P.; Paulweber, B.; Schernthaner, C.; Toell, T.; Egger, G.; Weger, S.; Oberhollenzer, M.; et al. Association Between Vascular Cell Adhesion Molecule 1 and Atrial Fibrillation. *Jama Cardiol* **2017**, *2*, 516–523. [CrossRef] [PubMed]
103. Demer, L.L.; Tintut, Y. Vascular calcification: Pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* **2008**, *117*, 2938–2948. [CrossRef] [PubMed]
104. De Groot, A.F.; Appelman-Dijkstra, N.M.; van der Burg, S.H.; Kroep, J.R. The anti-tumor effect of RANKL inhibition in malignant solid tumors—A systematic review. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *62*, 18–28. [CrossRef] [PubMed]
105. Murakami, K.; Kobayashi, Y.; Uehara, S.; Suzuki, T.; Koide, M.; Yamashita, T.; Nakamura, M.; Takahashi, N.; Kato, H.; Udagawa, N.; et al. A Jak1/2 inhibitor, baricitinib, inhibits osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression in osteoblasts in vitro. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0181126. [CrossRef] [PubMed]
106. St Hilaire, C.; Ziegler, S.G.; Markello, T.C.; Brusco, A.; Groden, C.; Gill, F.; Carlson-Donohoe, H.; Lederman, R.J.; Chen, M.Y.; Yang, D.; et al. NT5E mutations and arterial calcifications. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 432–442. [CrossRef] [PubMed]
107. Ghalamfarsa, G.; Kazemi, M.H.; Raoofi Mohseni, S.; Masjedi, A.; Hojjat-Farsangi, M.; Azizi, G.; Yousefi, M.; Jadidi-Niaragh, F. CD73 as a potential opportunity for cancer immunotherapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2019**, *23*, 127–142. [CrossRef] [PubMed]
108. Abdel-Magid, A.F. Inhibitors of CD73 May Provide a Treatment for Cancer and Autoimmune Diseases. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 781–782. [CrossRef]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Elsevier Editorial System(tm) for Canadian Journal of Cardiology

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Association between Growth differentiation factor-15 and heart failure complicating acute myocardial infarction

Article Type: Original Research Clinical

Corresponding Author: Professor Catherine VERGELY,

Corresponding Author's Institution: Inserm URM866 - Université de Bourgogne

First Author: Alexandre MELOUX

Order of Authors: Alexandre MELOUX; Luc ROCHETTE; Maud MAZA; Florence BICHAT; Yves COTTIN; Marianne ZELLER; Catherine VERGELY

Abstract: Background and Purpose - Growth differentiation factor 15 (GDF15) is an emerging biomarker in cardiovascular (CV) diseases. We aimed to evaluate the association of GDF15 levels at admission with HF occurrence during the hospitalization for an acute myocardial infarction (AMI).
Methods - In our prospective study, all consecutive patients admitted from June 2016 to February 2018 for type 1 AMI in Coronary Care Unit of CHU Dijon Bourgogne were included. In-hospital severe HF was defined as Killip class>2. Blood samples were taken on admission and serum levels of GDF15 were measured using a commercially available ELISA kit.
Results - Among the 284 AMI patients, median age was at 67 years, 27% were women. GDF15 levels (median = 1.144 ng/L were strongly correlated with age (r = 0.493, p < 0.001) and with most CV risk factors (i.e. hypertension, diabetes, chronic kidney disease) (p < 0.001 for all) and in patients with CRP > 3 mg/L (p < 0.001). When compared with patients without HF (274/284), GDF15 in patients with in-hospital HF (10/284) was more than twice higher. Multivariate regression showed that GDF15>5,000 ng/L [OR: 8.43; 95% CI (1.57-45.32); p=0.013] was as independent estimate of HF.
Conclusions - These results suggest that GDF15 could be an integrative biomarker of severe in-hospital HF in patient with AMI. Further studies are needed to elucidate the underlying mechanisms linking the cytokine with the development of HF.

Suggested Reviewers: Jean-Lucien Rouleau
jean.rouleau@umontreal.ca

Denis Angoulvant
denis.angoulvant@univ-tours.fr

Lucas Liaudet
Lucas.Liaudet@chuv.ch

Opposed Reviewers:

Cover Letter

Laboratoire de Recherche
Physiopathologie et Epidémiologie Cérébro-Cardiovasculaires (PEC2)
FACULTES des Sciences de Santé
7 Bd Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 DIJON Cedex - France
Tél. : 03 80 39 34 60 - Fax : 03 80 39 32 93
e.mail : catherine.vergely@u-bourgogne.fr

Dijon, May 23h 2019

Dear Editor,

On behalf of my co-authors, I am submitting the enclosed manuscript, which represents original, unpublished material, for possible publication in CANADIAN JOURNAL OF CARDIOLOGY:

Association between Growth differentiation factor-15 and heart failure complicating acute myocardial infarction.

Alexandre Meloux; Luc Rochette; Maud Maza; Florence Bichat; Yves Cottin; Marianne Zeller; Catherine Vergely.

All authors have read and approved the submitted manuscript.

The manuscript is not currently under consideration elsewhere and the work reported will not be submitted for publication elsewhere until a final decision has been made as to its acceptability by CANADIAN JOURNAL OF CARDIOLOGY.

Yours sincerely,

*Manuscript
Click here to view linked References

Association between Growth differentiation factor-15 and heart failure complicating acute myocardial infarction.

Alexandre Meloux[1,2*], PharmD; Luc Rochette[1], PharmD, PhD; Maud Maza[2], MSc; Florence Bichat[2], PhD; Yves Cottin[1,2],MD, PhD; Marianne Zeller[1], PhD; Catherine Vergely[1], PharmD, PhD.

[1] Laboratoire « Physiopathologie et Epidémiologie Cérébro-Cardiovasculaires » (PEC2, EA 7460), Université de Bourgogne-Franche-Comté; UFR des Sciences de Santé; 7 Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon - France

[2] Department of Cardiology - University Hospital of Dijon, France

*Address correspondence to this author: Tel: +33-380393292; Fax: +33-380393293

E-mail address: alexandre.meloux@u-bourgogne.fr

Short title: GDF15 in HF complicating AMI

Word count: 3533 words

Brief summary

In this prospective preliminary study, we evaluated the prognostic value of growth differentiation factor-15 (GDF15) as a predictor of heart failure (HF) complicating acute myocardial infarction (AMI). Among the 284 AMI patients, GDF15 levels were more than twice higher in patients with severe HF than in patients without HF. Multivariate regression analysis showed that high GDF15 was an independent estimate of HF. GDF15 could be a relevant biomarker of in-hospital HF in patient with AMI.

Abstract

Background and Purpose - Growth differentiation factor 15 (GDF15) is an emerging biomarker in cardiovascular (CV) diseases. We aimed to evaluate the association of GDF15 levels at admission with HF occurrence during the hospitalization for an acute myocardial infarction (AMI).

Methods - In our prospective study, all consecutive patients admitted from June 2016 to February 2018 for type 1 AMI in Coronary Care Unit of CHU Dijon Bourgogne were included. In-hospital severe HF was defined as Killip class>2. Blood samples were taken on admission and serum levels of GDF15 were measured using a commercially available ELISA kit.

Results – Among the 284 AMI patients, median age was at 67 years, 27% were women. GDF15 levels (median = 1.144 ng/L were strongly correlated with age ($r = 0.493$, $p < 0.001$) and with most CV risk factors (i.e. hypertension, diabetes, chronic kidney disease) ($p < 0.001$ for all) and in patients with CRP > 3 mg/L ($p < 0.001$). When compared with patients without HF (274/284), GDF15 in patients with in-hospital HF (10/284) was more than twice higher. Multivariate regression showed that GDF15>5,000 ng/L [OR: 8.43; 95% CI (1.57-45.32); p=0.013] was as independent estimate of HF.

Conclusions - These results suggest that GDF15 could be an integrative biomarker of severe in-hospital HF in patient with AMI. Further studies are needed to elucidate the underlying mechanisms linking the cytokine with the development of HF.

Key words: Heart failure, GDF15, AMI

Introduction

Patients with acute myocardial infarction (AMI) constitute a large and heterogeneous group in terms of severe outcomes and subsequent death. Heart failure (HF) complicating AMI is frequent and is associated with high mortality and re-hospitalisation rates [1]. HF complicating AMI has an incidence ranging from 14% to 36% [2].It is characterized by signs such as crackles, lung rales, tachycardia, pulmonary edema, hypotension and electrocardiographic abnormalities, classified through the Killip classification that underscores the gravity of HF. Both severe (cardiogenic shock) and less severe states HF have major adverse consequences and may require specific treatments different than for AMI patients without HF. Therefore, adequate risk stratification in patients who will develop HF in the context of post-AMI may be helpful in estimating prognosis and may guide the cardiologist in clinical decision making. Indeed, cardiac biomarkers such as cardiac-Troponin (c-Tn) or N-Terminal pro-Brain Natriuretic Peptide (NT-proBNP) [3, 4] currently provide prognostic information for both short- and long-term risk in patients with AMI. However, newer and more specific biomarkers may be helpful in providing additional information not supported by classic biomarkers.

Growth differentiation factor 15 (GDF15) is a stress-responsive cytokine which belongs to the superfamily of the transforming growth factor-β but seems finally to be closer to the glial cell-derived neurotrophic factors [5]. Although GDF15 is weakly expressed in normal healthy conditions in human tissues, except in placenta, GDF15 can be produced by many cardiovascular and non-cardiovascular cell types under certain pathological situations mainly related to inflammatory stress. Circulating levels of GDF15 reflect acute and chronic cellular stressors which are associated with aging and disease [6, 7]. Indeed, in cardiovascular (CV) diseases, GDF15 is a highly emerging biomarker [8] with a strong predictive value for all cause of mortality. In patients with AMI, GDF15 has been recognized as a consistent

biomarker of mortality and at long-term follow-up in patients with non ST-elevation MI [9-13]. In this context, GDF15 provided prognostic information beyond that provided by other clinical or biochemical biomarkers including cTnT and NT pro-BNP [10, 14-16]. Other data also suggest GDF15 as a biomarker in acute or chronic HF with preserved or reduced ejection fraction [17-21].

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the prognostic value of GDF15 levels at admission as a predictor of HF occurrence during the hospitalization for an AMI.

Methods

Patients

In this prospective study, all consecutive patients admitted from June 2016 to February 2018 for type 1 AMI in the Coronary Care Unit from the Dijon University Hospital (France) were included in the RICO database (ObseRvatoire des Infarctus de Côte-d'Or). Methods and design of this French regional survey of AMI have been previously described [22]. AMI was diagnosed in accordance with the third universal MI definition [23]. Patients with previous HF as well as patients with Killip > 2 on admission were excluded. Severe HF was defined by Killip class > 2. Patients were analysed into two groups i.e. no HF group (nHFg) and a HF group (HFg). This study's protocol conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of Dijon University Hospital. All of the participants provided consent before inclusion.

Data collection

Patient's demographic data, cardiovascular risk factors and history were collected, in the same way as clinical and biological data. In order to assess the mortality risk, the GRACE score was calculated [24]. Blood samples were harvested on admission to measure serum C-reactive protein (CRP), creatinine, Troponin Ic peak, NT-proBNP, blood lipids and glucose. eGFR was calculated using Chronic Kidney Disease-EPIdemiology Collaboration formula (CKD-EPI). Echocardiography was used to determine left ventricular ejection fraction (LVEF). Chronic and acute medications were also recorded. Finally, in-hospital events were documented, including death, CV death, re-infarction, stroke and development of HF.

Determination of serum GDF15

Blood samples were collected from a vein of the arm, immediately centrifuged at 4°C to separate the serum and samples were stored at -80°C until use. Serum GDF15 was measured in duplicate using a commercially available kit (DGD150, R&D systems, MN). The minimum

detectable concentration was 2 ng/L, and the coefficient of variation between duplicates did not exceed 10%.

Statistical analysis

Dichotomous variables are expressed as n (%) and continuous variables as mean ± SD or median [interquartile range]. A Kolmogorov-Smirnov test was performed to test the normality of continuous variables. The Mann-Whitney test or Student's t test, was used to compare continuous data, and the Chi 2 test or Fisher's test was used for dichotomous data, as appropriate.

Pearson correlation analyses (for normally distributed variables) or Spearman correlation analyses (one or two non-Gaussian variables) were performed. The threshold for significance was set at 5%.

Bivariate linear regression analyses were used to adjust GDF15 with age.

Multivariate logistic regression models were built to estimate in-hospital HF based on significant variables in univariate analysis. Inclusion threshold was set at 5%.

SPSS version 12.0.1 (IBM Inc, USA) was used for all of the statistical tests.

Results

Baseline characteristics

Among the 284 included patients, 274 (96%) did not develop HF and 10 (4%) presented HF during the hospital stay. Median intensive care unit length of stay was significantly higher in patients with HF than without HF. Seventy-six (27%) were female, median age was 67 years, 66 (23%) had diabetes and 168 (59%) had hypertension. Median GDF15 level was 1,131 (771-1,811) ng/L. Table 1 shows patients' characteristics with comparison between patients with or without HF. HF patients were older than patients without HF. However, no differences were reported in CV risk factors or in CV history between groups. From a clinical point of view, HF patients had a lower systolic blood pressure on admission and a higher GRACE risk score. Renal function was more impaired in HF patients (eGFR: 85 [68-97] vs 69 [44-80] mL/min). Obviously, NT-proBNP levels were higher in HF patients. LDL-cholesterol levels were lower in HF patients. Concerning all cause of mortality, there was no difference between the two groups of patients. Regarding medications, no difference was observed for chronic treatments but HF patients had less treatment than the others.

Associations between GDF15 levels and HF

GDF15 levels were much higher in patients with HF compared to patients without (1,644 ± 90 vs. 4,236 ± 1,103 ng/L, p=0.021, Fig 1). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis identified the cut-off value for GDF15 at 4,981 ng/L, to estimate HF risk, which has been rounded to 5,000 ng/L for more clinical relevance. The area under the curve (AUC) was 0.716 (p= 0.021) and the sensitivity and specificity were correct (50% and 95%, respectively). By univariate analysis, age (OR 1.06, 95% CI 1.01-1.11; p=0.027), systolic blood pressure (OR 0.97, 95% CI 0.95-1.000; p=0.038), LVEF (OR 0.93, 95% CI 0.89-0.98; p=0.010), log NT-proBNP (OR 3.03; 95% CI 1.32-6.92; p=0.009) and GDF15 > 5,000 ng/L (OR 20.08; 95% CI 5.16-78.14; p<0.001) were associated with the onset of HF. There is a gradual

relationship between GDF15 and Killip ($p<0.001$). In multivariate analysis, high GDF15 remained associated with onset of HF, after adjustement for confounding (Table 2), even beyond traditional HF biological marker such as NT-proBNP levels or clinical marker such as LVEF. Quality index suggested that the model was correct (-2LL=63.308; pHL=0.487; %class=96.5)).

Discussion

The present study shows that GDF15 levels at admission in patients with AMI may help to predict the occurrence of severe HF during hospitalization, beyond traditional markers.

The stress-responsive cytokine GDF15 has been associated with unfavorable clinical outcome both in AMI and HF. In STEMI patients, strong correlations between GDF15 levels and major adverse cardiac events [11] have been documented. Moreover, admission GDF15 concentrations are closely related to all-cause mortality in NSTEMI patients [10] providing prognostic information beyond that provided by established clinical and biochemical markers. In 18,876 patients with AMI from the PLATO study, mortality rates were shown to be significantly increased in patients with high circulating GDF15 [25]. Increased concentrations of GDF15 also identified patients at increased risk for adverse left ventricular remodeling [11, 26] and recurrent events such as re-hospitalization for congestive HF within 2 years [27].

In the present study, the median concentration of GDF15 in patients hospitalized for AMI (1,144 ng/mL) was slightly lower than observed in patients with AMI [25] (1,550 ng/mL) but still in the range of concentrations observed in this population. We observed that in AMI patients, GDF15 circulating levels were positively associated with classical cardiovascular risk factors such as age, hypertension, diabetes, chronic kidney disease, coronary artery disease, CRP, NT-proBNP, and C-TnI peak. In patients with stable or acute coronary artery disease, multivariate regression analysis showed that advanced age, diabetes, acute hyperglycemia, and chronic kidney disease were independent predictors of elevated GDF15 levels [28]. Indeed, even in patients free of clinically overt cardiovascular diseases, GDF15 was positively associated with age, smoking, antihypertensive treatment, diabetes, and worse kidney function [29]. In elderly community-dwelling individuals, changes in GDF15 levels were also related to male sex, hypertension, diabetes, HF, impaired renal function, and concentrations of NT-proBNP [30].

In patients admitted for AMI, HF is a frequent complication, which may be present at admission or develop during the hospitalization, and is associated with a substantial increased risk of death by at least 3- to 4-fold [1]. Patients with clinical signs of HF on admission to the hospital are usually older, with more frequent recurrent ischemia and diabetes. Development of HF during hospital stay is usually related to infarct size, mechanical complications, or myocardial stunning. Determining patients with HF complicating AMI is of major importance since they will require targeted treatments than those without HF. Biomarkers of HF, such as NT-proBNP have been shown to be strong independent predictors of risk. However, in the context of AMI, GDF15 can be used to identify patients at high risk at short or long term follow-up [13]. Moreover, in HF patients with preserved or reduced ejection fraction, results suggest that beyond hemodynamic stress evaluated through NT-proBNP elevation, inflammatory context related to GDF15 may play an important role [20]. Furthermore, it has been shown that GDF15 was a prognostic biomarker in patients with HF with preserved ejection fraction [31]. In the present work, we identified admission circulating levels of GDF15 as strong predictors of the occurrence of severe in-hospital HF, beyond NT-proBNP levels.

So far, little is known about the tissues that produce GDF15 in patients with cardiovascular disease, although GDF15 was shown to be upregulated in the heart after an AMI [32]. However, in patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy, the heart does not seem to be an important source of GDF15 production, suggesting that GDF15 might also originates from peripheral tissues [33]. In the present context, higher GDF15 levels in patients that will develop HF during their hospitalization may be related to increased infarct size, a hypothesis that is consistent with our observation of a positive correlation between cTnI peak and GDF15 levels. The association with other determinants of in-hospital HF such as myocardial mechanical dysfunction or stunning is not excluded. However as a biomarker, GDF15 may carry additional information than traditional clinical or biochemical cardiovascular risk

factors. In the long-term, increased GDF15 concentrations were shown to identify patients at risk for re-hospitalization for new or worsening HF [27], independently of other biomarkers such as hs-CRP and NT-proBNP. GDF15 may reflect non-overlapping disease pathway contributing to the development of HF after AMI. Notably, changes in GDF15, in contrast to hs-CRP variations, are strong predictors of major cardiovascular events [34].

Study limitations

The weak number of patients developing HF (n=10), and consequent lack of statistical power, was a major limit for the conclusions to draw from our study. However, the association between the biomarker and the event (HF) was significant (p=0.021), further supported by both univariate regression analysis ($p<0.001$) and AUC (p= 0.021), and persisted even after adjustment for major determinants of HF (p=0.013). Larger studies are needed to confirm these preliminary findings.

Conclusions

To conclude, our preliminary study shows that GDF15 could be an integrative biomarker of severe in-hospital HF in patient with AMI. Experimental studies are needed to elucidate the underlying mechanisms linking the cytokine with the development of HF.

Acknowledgments

We thank Morgane Laine for technical assistance.

Funding sources

This study has been supported by grant from the French Ministry of Research, from Regional Council of Bourgogne-Franche Comté, from the University Hospital Dijon Bourgogne and from the Association de Cardiologie de Bourgogne.

Disclosures

No conflicts

Table 1: Patients' characteristics

	Global (n=284)	nHFg (n = 274)	HFg (n = 10)	p value
CV risk factors				
Age (years)	67 (57-78)	67 (± 15)	78 (± 13)	0.022
Female	76 (27)	73 (27)	3 (30)	0.730
BMI (kg/m²)	26 (24-30)	26 (24-30)	28 (24-30)	0.954
Hypertension	168 (59)	162 (59)	6 (60)	1.000
Diabetes	66 (23)	63 (23)	3 (30)	0.703
Hypercholesterolemia	107 (38)	105 (38)	2 (20)	0.329
Family history of CAD	70 (25)	69 (25)	1 (10)	0.460
Current smoking	84 (30)	83 (30)	1 (10)	0.290
CV history				
CAD	47 (17)	45 (16)	2 (20)	0.673
Stroke	16 (6)	16 (6)	0 (0)	1.000
Chronic kidney disease	14 (5)	13 (5)	1 (10)	0.402
Clinical data				
LVEF	55 (50-60)	55 (50-60)	45 (36-61)	0.111
HR (bpm)	76 (64-87)	76 (64-86)	73 (57-107)	0.892
SBP (mmHg)	141 (123-165)	145 (± 29)	125 (± 25)	0.035
DBP (mmHg)	82 (70-94)	83 (± 18)	76 (± 20)	0.202
STEMI	140 (49)	134 (49)	6 (60)	0.537
GRACE risk score	139 (116-167)	140 (± 35)	169 (± 30)	0.010
ICU stay length (days)	3 (3-4)	3 (3-4)	5 (5-9)	< 0.001
Biological data				
CRP ≥ 3 mg/L	149 (53)	141 (52)	8 (80)	0.111
Creatinine clearance (CKD EPI) (mL/min)	83 (67-96)	85 (68-97)	69 (44-80)	0.020
Peak troponin Ic (ng/mL)	15 (3-70)	15 (3-73)	22 (1-53)	0.555
NT-proBNP (pg/mL)	363 (86-1,456)	352 (84-1,415)	2217 (783-8,401)	0.010
Glucose (mmol/L)	7 (6-8)	7 (6-8)	7 (6-9)	0.483
LDL cholesterol (g/L)	1.2 (0.9-1.5)	1.2 (± 0.4)	0.9 (± 0.5)	0.046
HDL cholesterol (g/L)	0.5 (0.4-0.6)	0.5 (0.4-0.6)	0.6 (0.4-0.7)	0.166
Triglycerides (g/L)	1.2 (0.8-1.7)	1.2 (0.8-1.8)	1.0 (0.6-1.3)	0.115
Chronic medications				
Antiplatelet	23 (8)	23 (8)	0 (0)	1.000
Aspirin	67 (24)	63 (23)	4 (40)	0.253
ARB	25 (20)	55 (20)	2 (20)	1.000
ACE inhibitors	55 (19)	53 (19)	2 (20)	1.000
Statin	84 (30)	81 (30)	3 (30)	1.000
Beta-blockers	75 (26)	72 (26)	3 (30)	0.727
Acute medications				
Antiplatelet	272 (96)	264 (96)	8 (80)	0.061
Aspirin	278 (98)	270 (98)	8 (80)	0.016
ARB	34 (12)	34 (12)	0 (0)	0.614
ACE inhibitors	172 (61)	171 (62)	1 (10)	0.001
Statin	260 (92)	253 (92)	7 (70)	0.043
Beta-blockers	200 (70)	198 (72)	2 (20)	0.001

Data are expressed as n (%) or mean (± standard deviation) or median (25th and 75th percentiles

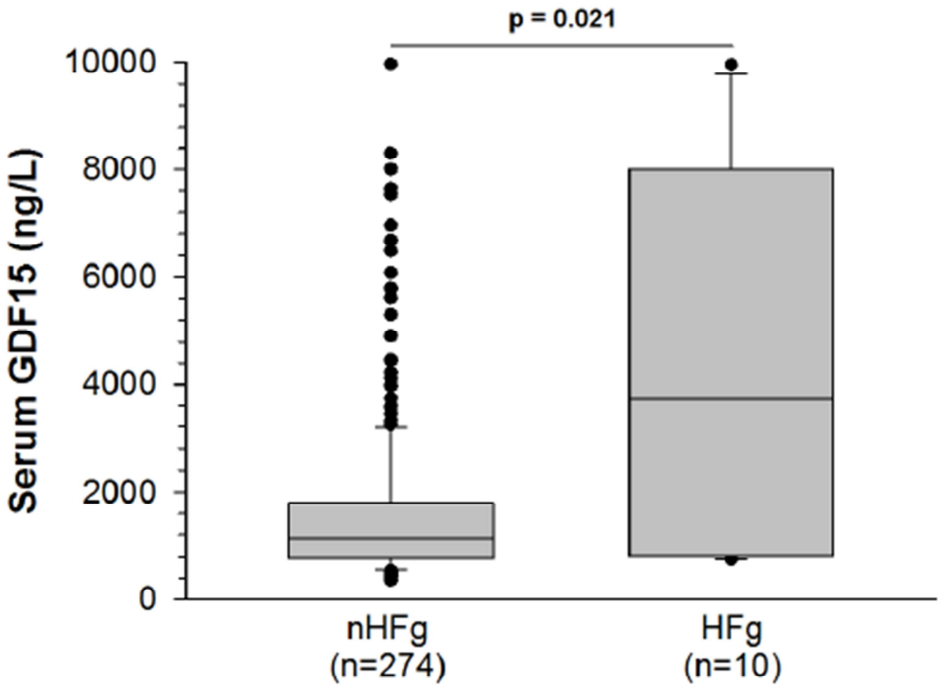
n: number; BMI: body mass index; CAD: coronary artery disease; LVEF: left ventricular ejection fraction; HR: heart rate; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; STEMI: ST segment elevation myocardial infarction; GRACE: Global Registry of Acute Coronary Events; ICU: Intensive Care Unit; CRP: C-reactive protein; NT-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide; LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein; ARB: angiotensin II receptor blockers; ACE inhibitors: angiotensin converting enzyme inhibitors.

Table 2: Logistic regression analysis to estimate severe HF development in AMI

	Univariate			Multivariate		
	OR	95% CI	p value	OR	95% CI	p value
Age, per year	1.06	1.01-1.11	0.027	1.03	0.98-1.09	0.249
SBP, per mmHg	0.97	0.95-1.000	0.038	0.98	0.96-1.01	0.247
LVEF, per %	0.93	0.89-0.98	0.010	0.97	0.91-1.03	0.294
Log NtproBNP, per unit	3.03	1.32-6.92	0.009	1.12	0.42-2.98	0.820
High GDF15, (>5,000 vs ≤5,000 ng/L)	20.08	5.16-78.14	< 0.001	8.43	1.57-45.32	0.013

SBP: systolic blood pressure; LVEF: left ventricular ejection fraction; NT-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide; GDF15: growth differentiation factor 15; OR: odds ratio; CI: confidence interval.

Figure 1: Serum growth differentiation factor 15 (GDF15) levels rise in heart failure (HF) patients after AMI than AMI patients without HF.



References

1. Bahit MC, Kochar A, Granger CB. Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *JACC. Heart failure*. 2018;6:179-186.
2. Hellermann JP, Jacobsen SJ, Gersh BJ, Rodeheffer RJ, Reeder GS, Roger VL. Heart failure after myocardial infarction: a review. *The American journal of medicine*. 2002;113:324-330.
3. Steinhart B, Thorpe KE, Bayoumi AM, Moe G, Januzzi JL, Jr., Mazer CD. Improving the diagnosis of acute heart failure using a validated prediction model. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:1515-1521.
4. McKie PM, Burnett JC, Jr. NT-proBNP: The Gold Standard Biomarker in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:2437-2439.
5. Emmerson PJ, Wang F, Du Y, et al. The metabolic effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL. *Nat Med*. 2017;23:1215-1219.
6. Kahli A, Guenancia C, Zeller M, et al. Growth differentiation factor-15 (GDF-15) levels are associated with cardiac and renal injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *PloS one*. 2014;9:e105759.
7. Guenancia C, Kahli A, Laurent G, et al. Pre-operative growth differentiation factor 15 as a novel biomarker of acute kidney injury after cardiac bypass surgery. *International journal of cardiology*. 2015;197:66-71.
8. Wollert KC, Kempf T, Wallentin L. Growth Differentiation Factor 15 as a Biomarker in Cardiovascular Disease. *Clinical chemistry*. 2017;63:140-151.
9. Wollert KC, Kempf T, Lagerqvist B, et al. Growth differentiation factor 15 for risk stratification and selection of an invasive treatment strategy in non ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation*. 2007;116:1540-1548.
10. Wollert KC, Kempf T, Peter T, et al. Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation*. 2007;115:962-971.
11. Eitel I, Blase P, Adams V, et al. Growth-differentiation factor 15 as predictor of mortality in acute reperfused ST-elevation myocardial infarction: insights from cardiovascular magnetic resonance. *Heart*. 2011;97:632-640.
12. Widera C, Pencina MJ, Meisner A, et al. Adjustment of the GRACE score by growth differentiation factor 15 enables a more accurate appreciation of risk in non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Eur Heart J*. 2012;33:1095-1104.
13. Damman P, Kempf T, Windhausen F, et al. Growth-differentiation factor 15 for long-term prognostication in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome: an Invasive versus Conservative Treatment in Unstable coronary Syndromes (ICTUS) substudy. *International journal of cardiology*. 2014;172:356-363.
14. Khan SQ, Ng K, Dhillon O, et al. Growth differentiation factor-15 as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2009;30:1057-1065.
15. Kempf T, Bjorklund E, Olofsson S, et al. Growth-differentiation factor-15 improves risk stratification in ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2007;28:2858-2865.
16. Schaub N, Reichlin T, Twerenbold R, et al. Growth differentiation factor-15 in the early diagnosis and risk stratification of patients with acute chest pain. *Clinical chemistry*. 2012;58:441-449.
17. George M, Jena A, Srivatsan V, Muthukumar R, Dhandapani VE. GDF 15--A Novel Biomarker in the Offing for Heart Failure. *Current cardiology reviews*. 2016;12:37-46.
18. Bettencourt P, Ferreira-Coimbra J, Rodrigues P, et al. Towards a multi-marker prognostic strategy in acute heart failure: a role for GDF-15. *ESC heart failure*. 2018;5:1017-1022.
19. Santhanakrishnan R, Chong JP, Ng TP, et al. Growth differentiation factor 15, ST2, high-sensitivity troponin T, and N-terminal pro brain natriuretic peptide in heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. 2012;14:1338-1347.

20. Chan MM, Santhanakrishnan R, Chong JP, et al. Growth differentiation factor 15 in heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction. *Eur J Heart Fail.* 2016;18:81-88.
21. Kempf T, von Haehling S, Peter T, et al. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1054-1060.
22. Zeller M, Steg PG, Ravisy J, et al. Relation between body mass index, waist circumference, and death after acute myocardial infarction. *Circulation.* 2008;118:482-490.
23. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation.* 2012;126:2020-2035.
24. Granger CB, Goldberg RJ, Dabbous O, et al. Predictors of hospital mortality in the global registry of acute coronary events. *Arch Intern Med.* 2003;163:2345-2353.
25. Hagstrom E, James SK, Bertilsson M, et al. Growth differentiation factor-15 level predicts major bleeding and cardiovascular events in patients with acute coronary syndromes: results from the PLATO study. *Eur Heart J.* 2016;37:1325-1333.
26. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Avanzas P. Relation of growth-differentiation factor 15 to left ventricular remodeling in ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2011;108:955-958.
27. Bonaca MP, Morrow DA, Braunwald E, et al. Growth differentiation factor-15 and risk of recurrent events in patients stabilized after acute coronary syndrome: observations from PROVE IT-TIMI 22. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:203-210.
28. Farhan S, Freynhofer MK, Brozovic I, et al. Determinants of growth differentiation factor 15 in patients with stable and acute coronary artery disease. A prospective observational study. *Cardiovascular diabetology.* 2016;15:60.
29. Ho JE, Mahajan A, Chen MH, et al. Clinical and genetic correlates of growth differentiation factor 15 in the community. *Clinical chemistry.* 2012;58:1582-1591.
30. Eggers KM, Kempf T, Wallentin L, Wollert KC, Lind L. Change in growth differentiation factor 15 concentrations over time independently predicts mortality in community-dwelling elderly individuals. *Clinical chemistry.* 2013;59:1091-1098.
31. Izumiya Y, Hanatani S, Kimura Y, et al. Growth differentiation factor-15 is a useful prognostic marker in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *The Canadian journal of cardiology.* 2014;30:338-344.
32. Kempf T, Eden M, Strelau J, et al. The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2006;98:351-360.
33. Lok SI, Winkens B, Goldschmeding R, et al. Circulating growth differentiation factor-15 correlates with myocardial fibrosis in patients with non-ischaemic dilated cardiomyopathy and decreases rapidly after left ventricular assist device support. *Eur J Heart Fail.* 2012;14:1249-1256.
34. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Hernandez-Baldomero IF, Avanzas P, Bosa-Ojeda F. Change in growth differentiation factor 15, but not C-reactive protein, independently predicts major cardiac events in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome. *Mediators of inflammation.* 2014;2014:929536.