

Université de Montréal

**Modifications de la matrice extracellulaire dans la
rigidité artérielle**

par

Simon Moreau

Université de Montréal

Faculté de Pharmacie

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

Novembre 2010

© Simon Moreau, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Modifications de la matrice extracellulaire dans la rigidité artérielle

Présentée par :
Simon Moreau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Marc Servant, président-rapporteur
Pierre Moreau, directeur de recherche
Guy Rousseau, membre du jury
Patrick Mathieu, examinateur externe
Térésa Kus, représentant du doyen de la FES

Résumé

La paroi vasculaire est composée de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses vasculaires et de fibroblastes qui sont entourés d'un réseau structuré et complexe de protéines, la matrice extracellulaire. Les interactions réciproques entre la matrice et les cellules sont nécessaires à la croissance, au développement et au remodelage. Or, différents contextes pathologiques entraînent la perturbation de ces interactions et sont la cause de différentes maladies.

Au cours du vieillissement, la matrice extracellulaire des grosses artères élastiques est modifiée. Ainsi, les lamelles élastiques de la paroi vasculaire se fragmentent ou sont dégradées, en plus de calcifier. De même, l'accumulation de protéines plus rigides, comme le collagène, entraîne le développement de la fibrose. Ces modulations vont mener à l'augmentation de la rigidité artérielle et au développement de l'hypertension systolique isolée.

En utilisant un modèle animal de calcification basé sur l'inhibition d'une protéine anti-calcifiante, la *matrix Gla protein*, avec la warfarine, nous avons étudié la séquence des événements impliqués dans le développement de l'hypertension systolique isolée. Nous avons observé l'activation précoce et transitoire de MMP-9, puis du TGF- β , précédant la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses vasculaires, la calcification et les changements hémodynamiques. L'inhibition des métalloprotéinases et du TGF- β a permis de prévenir la calcification vasculaire.

Nous avons également étudié le rôle joué par une enzyme de la matrice extracellulaire, la transglutaminase 2, dans le développement de la calcification associée à l'hypertension systolique isolée. À l'aide d'un nouvel inhibiteur de cette enzyme, qui a permis de prévenir la calcification, nous avons établi que la transglutaminase était un élément clé dans le processus pathologique.

Ces travaux ont permis de démontrer l'intérêt de nouvelles avenues thérapeutiques ciblant directement la matrice extracellulaire, particulièrement la MMP-9, le TGF- β et la transglutaminase 2, dans la pathologie de l'hypertension systolique isolée.

Mots-clés : hypertension systolique isolée, rigidité artérielle, calcification, MMP-9, TGF- β , transglutaminase, matrice extracellulaire.

Abstract

Within the vascular wall, endothelial cells, vascular smooth muscle cells and fibroblasts are surrounded by a complex and structured network of secreted macromolecules and proteins, the extracellular matrix. Reciprocal interactions between matrix and cells are essential to growth, development and remodeling. However, in pathological situations, the alteration of these interactions can lead to the development of different disease states.

With aging, the extracellular matrix of large elastic arteries undergoes several modifications. The elastic lamellae are fragmented or degraded and calcify, whereas more rigid proteins, such as collagen, accumulate and cause fibrosis. These alterations are associated with the stiffening of arteries, which results in the development of isolated systolic hypertension.

In order to study the sequence of events occurring in the development of this pathology, we used an animal model of calcification based on the inhibition of a *matrix Gla protein*, which physiologically prevents calcification, with warfarin. We observed an acute and transient activation of MMP-9 and TGF- β , which preceded the phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells, calcification and changes to hemodynamic parameters. Moreover, the inhibition of MMPs and TGF- β prevented vascular calcification.

We also studied the role of an extracellular matrix enzyme, transglutaminase 2, in the development of vascular calcification associated with isolated systolic hypertension. Using a novel inhibitor of this enzyme, we established a key role for transglutaminase 2 in this pathological process.

This thesis demonstrates the relevance of directly targeting the extracellular matrix, particularly MMP-9, TGF- β and transglutaminase 2, as a novel therapeutic avenue in the treatment of isolated systolic hypertension.

Keywords : Isolated systolic hypertension, MMP-9, TGF- β , transglutaminase, calcification, extracellular matrix vascular stiffness.

Table des matières

Introduction.....	2
1. Paroi vasculaire.....	3
1.1. Composition.....	4
1.1.1. Cellules.....	4
A. Cellules endothéliales.....	4
B. Cellules musculaires lisses.....	5
C. Fibroblastes.....	9
1.1.2. Matrice extracellulaire.....	9
A. Composantes structurales.....	10
a. Collagène.....	10
i. Collagènes fibrillaires.....	11
ii. Collagènes non-fibrillaires.....	12
iii. Collagènes formant des réseaux.....	13
b. Fibres élastiques.....	14
i. Élastine.....	14
ii. Fibrilline.....	16
iii. Glycoprotéines associées aux microfibrilles.....	17
iv. Fibulines.....	17
v. EMILIN-1.....	18
vi. Élastogénèse.....	18
B. Autres composantes.....	20
i. Protéoglycans.....	20
ii. Fibronectine.....	22
iii. Laminines.....	23
iv. Nidogènes.....	23
v. Thrombospondines.....	24
vi. SPARC/ostéonectine.....	25

vii. Tenascines.....	25
viii. Vitronectine	26
ix. TGF- β	26
C. Stabilisation de la matrice extracellulaire	30
a. Lysyl oxydase.....	30
b. Transglutaminases.....	31
D. Déstabilisation de la matrice extracellulaire	38
a. Métallo-endopeptidases.....	39
i. Les astacines	40
ii. Les serralysines.....	40
iii. Les pappalysines.....	41
iv. Les adamalysines	41
v. Métalloprotéinases matricielles	43
b. Les sérines endopeptidases	45
c. Les cystéines endopeptidases	46
E. Matrikines.....	47
F. Récepteurs de la matrice extracellulaire	47
a. Les intégrines	48
b. Récepteurs à domaine discoïdine.....	50
c. Récepteur de l'élastine et de la laminine.....	51
d. Le dystroglycan.....	52
1.2. Structure, organisation et fonctions	53
1.3. Mécanique.....	60
1.4. Remodelage artérielle dans l'hypertension systolo-diastolique.....	63
2. Vieillesse vasculaire	69
2.1. Changements au niveau de la matrice extracellulaire.....	69
2.1.1. Fibres élastiques.....	69
A. Fatigue mécanique du réseau élastique.....	70
B. Dégradation	71

C. Calcification	74
2.1.2. Fibrose.....	77
2.2. Changements cellulaires	80
2.2.1. Cellules musculaires lisses vasculaires.....	80
2.2.2. Cellules endothéliales	83
2.3. Rigidité artérielle et hypertension systolique isolée	84
2.3.1. Mesure de la rigidité artérielle	84
2.3.2. Conséquences hémodynamiques de la rigidité artérielle.....	88
2.3.3. Conséquences sur les organes cibles.....	91
A. Le coeur.....	91
B. Artères de résistance.....	91
2.3.4. Traitement de l'hypertension systolique isolée.....	92
A. Style de vie sain	92
B. Traitement pharmacologique.....	93
2.3.5. Modèles animaux	97
A. Modèle de vieillissement	97
B. Modèles génétiques	98
a. Souris déficientes en MGP.....	98
b. Souris déficientes en MGP et OPN.....	100
C. Modèles d'induction chimique.....	100
a. Modèle vitamine D et nicotine	100
b. Modèle de chlorure de calcium.....	101
c. Modèle warfarine-vitamine K (WVK).....	102
2.3.6. Modèles in vitro et ex vivo	106
Objectifs.....	107
Résultats.....	108
3. Sequential Activation of Matrix Metalloproteinase 9 and Transforming Growth Factor β in Arterial Elastocalcinosis	109
3.1. Résumé.....	110

3.2. Abstract.....	111
3.3. Introduction.....	113
3.4. Methods.....	115
3.5. Results.....	120
3.6. Discussion.....	130
3.6.1. Acknowledgements.....	134
3.7. References.....	135
4. Transglutaminase 2 : A Key Element in the Development of Vascular Calcification Associated with Isolated Systolic Hypertension.....	139
4.1. Résumé.....	140
4.2. Abstract.....	141
4.3. Introduction.....	143
4.4. Methods.....	145
4.5. Results.....	149
4.6. Discussion.....	157
4.6.1. Acknowledgements.....	162
4.7. References.....	163
Discussion et conclusion.....	168
A. Cibles au niveau de la synthèse de la matrice extracellulaire.....	171
a. Le TGF- β	171
b. La transglutaminase 2.....	173
B. Cibles au niveau de la dégradation de la matrice extracellulaire.....	175
C. Conclusion.....	177
Bibliographie.....	173
Annexes.....	i
Annexe 1 Fluorescent Probes of Tissue Transglutaminase Reveal Its Association with Arterial Stiffening.....	ii
Annexe 2: Liste des publications.....	xl

Liste des tableaux

Tableau 1 : Facteurs régulant la synthèse d'élastine in vitro	15
Tableau 3 : Principaux substrats de la transglutaminase 2	37
Tableau 4 : Facteurs de risque cardiovasculaires et dommages aux organes cibles	64
Tableau 5 : Modifications au style de vie pour prévenir l'augmentation ou améliorer le contrôle de la tension artérielle	67
Tableau 6 : Évolution du pourcentage de la population hypertendue conscientisée, traitée et dont la tension artérielle est contrôlée entre 1976 et 2000 selon le NHANES (<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>).	68
Tableau 7 : Définitions des paramètres de mesure de la rigidité artérielle	87
Tableau 8 : Avantages et inconvénients des différents modèles animaux de calcification vasculaire médiale.....	105

Liste des figures

Figure 1 : Mécanismes de contraction des CMLVs.....	7
Figure 2 : Mécanismes de relaxation des CMLVs.....	8
Figure 3 : Représentation d'une fibre de collagène	11
Figure 4 : Représentation de l'élastogénèse.....	19
Figure 5 : Signalisation canonique du TGF- β	28
Figure 6 : Formation de liaisons covalentes par la transglutaminase	32
Figure 7 : Conformations inactive (A) et active (B) de la TG2	34
Figure 8 : Structure des domaines des ADAM et ADAMTS	43
Figure 9 : Sous-groupes d'intégrines	49
Figure 10 : Les trois couches de la paroi vasculaire	54
Figure 11 : Composition des différents types de vaisseaux sanguins, diamètre luminal et distribution du volume sanguin (en %).	55
Figure 12 : Pressions et aires de sections des différents segments vasculaires	58
Figure 13 : Courbe de l'élasticité vasculaire en fonction de la pression.....	60
Figure 14 : Relations entre les dimensions, les forces exercées et les paramètres physiologiques.	61
Figure 15 : Remodelages eutrophique et hypertrophique.....	66
Figure 16 : Désorganisation et fragmentation des fibres élastiques dues à la fatigue mécanique	70
Figure 17 : Fragmentation de l'élastine et augmentation de l'expression de MMP2 dans l'aorte de rats âgés de 2, 8 ou 30 mois.	72
Figure 18 : Corrélation entre la rigidité artérielle et la quantité de MMP-9 dans le sérum ..	73
Figure 19 : Calcification chez la souris déficiente en MMP-2 ou MMP-9.....	76
Figure 20 : Propriétés de l'élastine et du collagène dans la paroi artérielle.....	79
Figure 21 : Voie de signalisation Wnt/ β -catenin	81
Figure 22 : Mesure de la vitesse de l'onde de pouls	86
Figure 23 : Mesure de l'index d'augmentation.....	86

Figure 24 : Effet tampon des grosses artères et pression périphérique.....	89
Figure 25 : Pressions systolique et diastolique de sujets âgés de 18 ans et plus.....	90
Figure 26 : Calcification aortique chez la souris $MGP^{-/-}$	99
Figure 27 : Calcification aortique dans le modèle $MGP^{-/-}OPN^{-/-}$ chez la souris	100
Figure 28 : Calcification aortique dans le modèle VDN.....	101
Figure 29 : Calcification aortique dans le modèle de calcification au $CaCl_2$ chez la souris	102
Figure 30 : Fonctionnement du modèle warfarine-vitamine K.....	103
Figure 31 : Calcification aortique dans le modèle WVK chez le rat	104
Figure 32: Projets de développement de médicaments ciblant la MEC	170

Liste des abréviations

AC : adénylate cyclase
 ADAM : *a disintegrin and metalloprotease*
 ADAMT : ADAM *with thrombospondin domain*
 AGE : produits de glycation avancée (*advanced glycation endproduct*)
 AMPc : adénosine monophosphate cyclique
 AngII : angiotensine II
 APC : *adenomatous polypolis coli*
 ARA : antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II
 ARNm : acide ribonucléique messenger
 ATP : adénosine triphosphate
 BCC : bloqueur des canaux calciques
 bFGF : *basic fibroblast growth factor*
 BMP : *bone morphogenic protein*
 Bpm : battements par minute
 cbEGF : *calcium binding epidermal growth factor like*
 Cbfa-1 : *core binding factor alpha 1*
 CCVD : canaux calciques voltage-dépendants
 CK : *cyclin kinase*
 CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire
 CSF : *colony stimulating factor*
 CTGF : *connective tissue growth factor*
 DAG : diacyl glycérol
 DASH : *dietary approaches to stop hypertension*
 DDR : récepteur à domaine discoïdine (*discoidin domain receptor*)
 deLNL : anhydrolysinnonorleucine
 DGPC : *dystrophin glycoprotein complex*
 DHEA : déhydroépiandrostérone
 Dvl : *dishevelled*
 EBP : *elastin binding protein*
 EGF : *epidermal growth factor*
 eNOS : NO synthase endogène
 Erk : *extracellular signal-regulated kinases*
 ET : endothéline
 ETRA : antagonistes des récepteurs à l'endothéline
 FACIT : *fibril associated collagens with interrupted triple helices*
 FAK : *focal adhesion kinase*
 FGF : *fibroblast growth factor*
 FN : fibronectine
 Fz : *frizzled*
 GAG : *glycosaminoglycan*

GC : guanylate cyclase
GDP : guanosine diphosphate
GMPc : guanosine monophosphate cyclique
GSK3 : *glycogen synthase kinase*
GTP : guanosine triphosphate
HDL : *high density lipoprotein*
HMG-CoA : *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA*
HSI : hypertension systolique isolée
HSP27 : *heat shock protein 27*
ICE : enzyme de conversion de l'interleukine (*interleukin conversion enzyme*)
IECA : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IGF : *insulin-like growth factor*
IGFBP : *insulin-like growth factor binding protein*
IL : interleukine
IMC : indice de masse corporelle
IP3 : inositol triphosphate
KO : *knock out*
LAP : *latent associated protein*
LDL : *low density lipoprotein*
LEF : *lymphoid enhancer factor*
LOX : lysyl oxydase
LRP : *LDL receptor-related protein*
LTBP : *latent TGF- β binding protein*
LTQ : lysyl tryrosine quinone
MAGP : glycoprotéine associée aux microfibrilles (*microfibril associated glycoprotein*)
MDC : *metalloprotease-like, disintegrin-like and cystein rich protein*
MEC : matrice extracellulaire
MEP : metallo-peptidase
MGP : *matrix gla protein*
MLCK : *myosin light chain kinase*
MLCP : *myosin light chain phosphatase*
MMP : métalloprotéinase matricielle (*matrix metalloproteinase*)
MT-MMP : *membrane type MMP*
Nase : neuraminidase
NE : norépinéphrine
NHANES : *National Health and Nutrition Examination Survey*
NO : monoxyde d'azote
NPP1 : *ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I*
OPN : ostéopontine
PAI : *plasminogen activator inhibitor*
PDGF : *platelet derived growth factor*
PECH : programme éducatif canadien sur l'hypertension
PI3K : *phosphoinositide 3-kinase*

PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PKG : protéine kinase G
PLC : phospholipase C
PP : pression pulsée
PP : protéine protectrice
PSI : *plexins, semaphorins and integrin*
RECK : *reversion-inducing cystein-rich protein with kazal motifs*
REL : réticulum endoplasmique lisse
RGD : arginine-glycine-aspartate
RS : réticulum sarcoplasmique
RTK : récepteur tyrosine kinase
SDS : sodium dodécyl sulfate
SERCA : *sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*
SH2 : *src-homology 2*
SHEP : *systolic hypertension in the elderly program*
SIBLING : *small integrin binding ligand, N-linked glycoprotein*
SLC : *small latent complex*
SLRP : *small leucine-rich proteoglycans*
SPARC : *secreted protein acidic rich in cystein*
SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone
TCF : *T-cell factor*
TG : transglutaminase
TGF β : *transforming growth factor beta*
TGF β R : *TGF β receptor*
TIMP : *tissue inhibitor of metalloproteinase*
TNF : *tumor necrosis factor*
TONE : *Trial of nonpharmacologic interventions in the elderly*
tPA : *tissue-type plasminogen activator*
TSP : thrombospondine
uPA : *urokinase-type plasminogen activator*
VDN : vitamine D nicotine
VKOR : vitamine K époxyde réductase
VKR : vitamine K réductase
WVK : warfarine vitamine K

*À ma femme et mes deux filles, qui
redéfinissent chaque jour ma notion du
bonheur*

*À mes parents, qui m'ont toujours soutenu,
encouragé, et qui ont fait de moi l'homme
que je suis aujourd'hui*

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, Pierre Moreau, d'avoir bien voulu me donner une chance dans son laboratoire malgré un budget serré en 2004. Merci de m'avoir guidé, enseigné et conseillé dans un milieu stimulant et équilibré. Merci à mes collègues de laboratoire : Céline Bouvet, Liz-Ann Gilbert, Rachida Essalihi, Daphné Girardot, Marielle Doyon, Mathieu « 1 » Brodeur, Mathieu « Spruce » Barrette, Joannie Blanchette, Léa Emonnot et Sonia Bouchard, qui m'ont « enduré » pendant des années, et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Je remercie aussi Louise Ida Grondin, pour son travail efficace et sa personnalité pétillante. Merci également au Dr Jeffrey Wayne Keillor, ainsi qu'à Nicolas Chabot et Amina Mulani, sans qui mon projet aurait été beaucoup plus laborieux. Je remercie aussi Dr Marc Servant et ses étudiants, particulièrement Simon-Pierre Gravel, Jean-François Clément, Annie Bibeau-Poirier et Priscilla Doyon, pour leur aide. Je tiens également à remercier les autres étudiants de la faculté, en particulier Nicolas Bertrand, Jérôme Maheux et Julie-Émilie Huot-Marchand, qui ont fait des heures du dîner et des activités facultaires des moments divertissants et remplis de rires.

Introduction

L'introduction de cette thèse abordera la composition de la paroi vasculaire, sa structure, son organisation et ses principales fonctions. Ensuite, elle traitera des changements subits par la paroi vasculaire au cours du vieillissement. Une attention particulière sera portée aux modifications de la matrice extracellulaire, comme la calcification et la fibrose, qui entraînent une augmentation de la rigidité artérielle et mènent au développement de l'hypertension systolique isolée. L'introduction se terminera par la présentation des objectifs de mon projet de doctorat. Par la suite seront présentés les résultats de mes travaux, sous forme d'articles. Ces résultats mèneront à une discussion abordant l'intérêt de cibler directement les modifications de la matrice extracellulaire pour traiter l'hypertension systolique isolée.

1. Paroi vasculaire

Le réseau vasculaire est un embranchement hiérarchisé et hautement organisé de vaisseaux sanguins, permettant l'accès à tous les organes de l'organisme. Les vaisseaux qui le composent peuvent ainsi assurer un apport optimal en oxygène aux tissus, exporter les métabolites toxiques vers le foie et éliminer les déchets via les reins. Pour se faire, ils régulent le flot sanguin de façon autonome. Finalement, les vaisseaux servent également d'autoroutes aux cellules immunitaires, qui assurent une surveillance en sillonnant l'organisme à la recherche de pathogènes. La localisation et la fonction des vaisseaux au sein de l'arbre vasculaire dictent les caractéristiques structurelles spécialisées qu'on y trouve. De façon générale, les composantes primaires demeurent les mêmes, bien que leur organisation et leur abondance relatives soient uniques à chaque type de vaisseaux. Ces composantes sont un amalgame de cellules et de matrice extracellulaire, un réseau de macromolécules sécrétées et d'enzymes protéolytiques.

1.1. Composition

1.1.1. Cellules

Les cellules qui composent la paroi vasculaire sont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les fibroblastes.

A. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont typiquement aplaties et polygonales¹, bien qu'elles puissent être rondes ou cubiques dans certaines veinules^{2,3}. Elles forment une monocouche cellulaire à l'interface entre le sang et le reste de la paroi vasculaire : l'endothélium. Constitué de plus de $1,6 \times 10^{13}$ cellules, l'endothélium d'un adulte a une surface estimée à 350m^2 et pèse près de 1kg ^{4,5}. Cette membrane semi-perméable recouvre la totalité du système vasculaire et contrôle l'échange de petites et de grosses molécules entre le sang et les tissus⁵ via le glycocalyx et différents complexes jonctionnels. L'attachement des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire sous-jacente se fait via un groupe de récepteurs d'adhésion présents à la surface cellulaire, les intégrines. Celles-ci assurent l'adhésion et la signalisation entre les cellules endothéliales et la matrice, en plus de maintenir l'alignement et la polarité des cellules tout au long du système vasculaire⁶. Longtemps perçu comme une structure inerte, l'endothélium est aujourd'hui considéré comme un organe⁷⁻⁹ dynamique ayant des fonctions cruciales, autant dans un contexte physiologique que pathologique.

Ainsi, les cellules endothéliales¹:

- jouent les rôles de barrière et de perméabilité
- synthétisent du collagène et des protéoglycans pour assurer le maintien de la membrane basale
- synthétisent et sécrètent des molécules provoquant la formation normale d'un thrombus (Facteur von Willebrand)
- synthétisent et sécrètent des molécules qui inhibent l'agrégation plaquettaire (prostacycline, thrombomoduline, monoxyde d'azote)
- sécrètent des substances vasoactives qui contrôlent le débit sanguin (monoxyde d'azote, endothéline, prostacycline)
- produisent des molécules qui modulent la réaction inflammatoire aiguë (IL-1, IL-6, IL-8) et les molécules d'adhésion cellulaire
- produisent certains facteurs de croissance comme le FGF (*fibroblast growth factor*), PDGF (*platelet derived growth factor*) et CSF (*colony stimulating factor*)

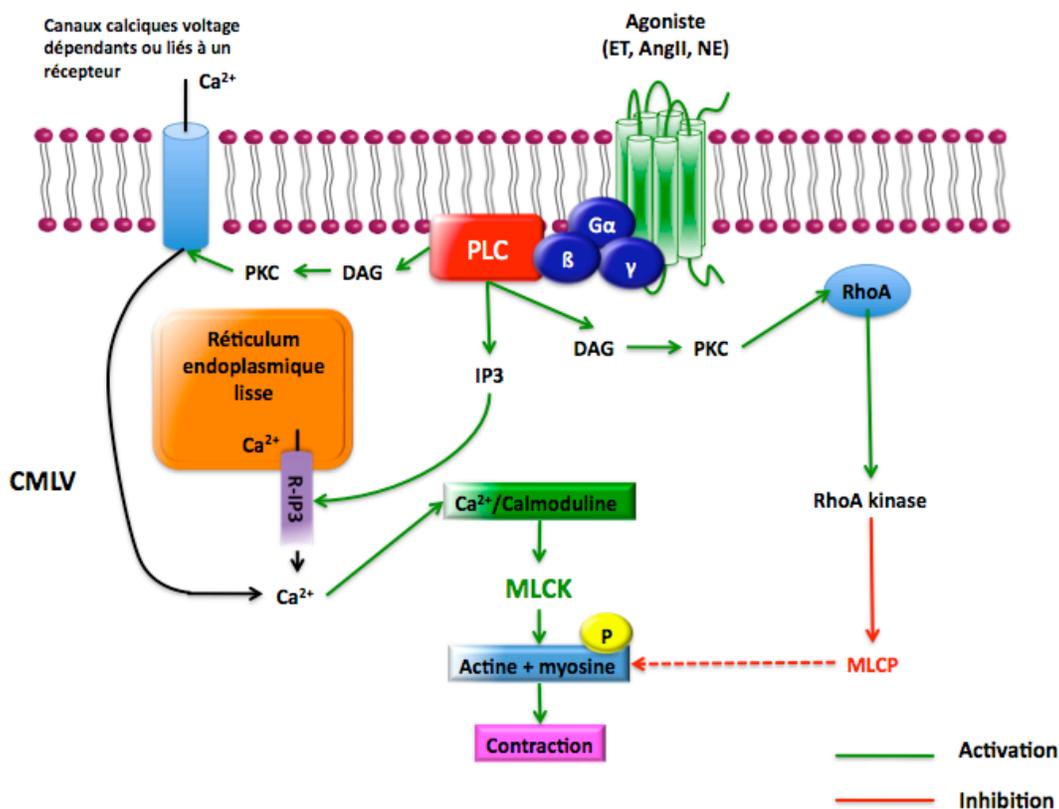
B. Cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) sont des cellules allongées, organisées de façon concentrique autour de la lumière du vaisseau, à l'exception de certaines veines et veinules où l'arrangement est plutôt longitudinal. Elles sont encapsulées individuellement par une membrane basale¹⁰, qui, en plus d'agir comme barrière, préserve leur phénotype contractile dans des tissus intacts¹¹. Les CMLVs sont reliées à la matrice extracellulaire (MEC) environnante grâce à différents récepteurs, principalement les intégrines¹². Le phénotype des CMLVs varie de « fibroblastique » durant les étapes du développement embryonnaire vers un phénotype « contractile » chez l'adulte. Le phénotype « fibroblastique », également nommé « synthétique » ou « sécrétoire », est caractérisé par l'absence d'une membrane basale, une synthèse protéique élevée et l'absence d'un appareil contractile au niveau du cytoplasme. De plus, on associe à ce phénotype un taux élevé de prolifération et de migration cellulaires^{13, 14}. De l'autre côté, les CMLVs « contractiles » ont une membrane basale, une capacité réduite à synthétiser des protéines, une augmentation de

myofilaments (actine et myosine) et une expression élevée d' α -actine. Ces cellules sont associées à un taux de prolifération extrêmement faible¹⁵. De plus, les CMLVs peuvent produire des cytokines, des facteurs de croissance, des protéines de la matrice extracellulaire et sont essentielles au maintien du tonus vasculaire¹⁶.

La contraction des CMLVs est associée à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Ca^{2+}). Celle-ci peut être initiée suite à une stimulation mécanique, électrique ou chimique. Dans le cas d'une stimulation chimique, un agoniste vasoconstricteur (endothéline, angiotensine II, noradrénaline) se lie à son récepteur à sept passages transmembranaires couplé à une protéine G ($G_{\alpha q}$, $G_{\alpha q/11}$, $G_{\alpha 12/13}$)^{17, 18} pour activer la phospholipase C (PLC) (Figure 1). Cette dernière entraîne la formation d'inositol triphosphate (IP_3) et de diacylglycerol (DAG). L' IP_3 se lie à des récepteurs du réticulum endoplasmique lisse, ce qui induit le relargage de Ca^{2+} activateur vers le cytosol. D'autre part, le DAG, de même que le Ca^{2+} lui-même, activent la protéine kinase C (α , β , ϵ)^{17, 18}, capable de phosphoryler certaines cibles impliquées dans la contraction, dont les canaux calciques voltage dépendants (CCVD). Au niveau du cytosol, le Ca^{2+} va ensuite se lier à la calmoduline pour former un complexe capable d'activer la *myosin light chain kinase* (MLCK). Cette dernière phosphoryle la chaîne légère de la myosine, ce qui permet l'interaction avec l'actine qui produira la contraction. La contraction prend fin lorsque la concentration de Ca^{2+} intracellulaire diminue. La *myosin light chain phosphatase* (MLCP) prend alors le dessus et induit la déphosphorylation de la chaîne légère de myosine. Puisque l'élévation de Ca^{2+} intracellulaire est seulement transitoire, la cellule utilise un mécanisme de sensibilisation permettant de prolonger la contraction. Ce mécanisme implique l'inhibition de la MLCP par la RhoA kinase et est activé en même temps que la PLC. Les mécanismes électriques de contraction provoquant l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire impliquent l'ouverture de canaux calciques voltage dépendant par l'augmentation du potentiel de membrane¹⁹. Un stress mécanique peut également induire l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire et la contraction des CMLVs²⁰.

Figure 1 : Mécanismes de contraction des CMLVs.

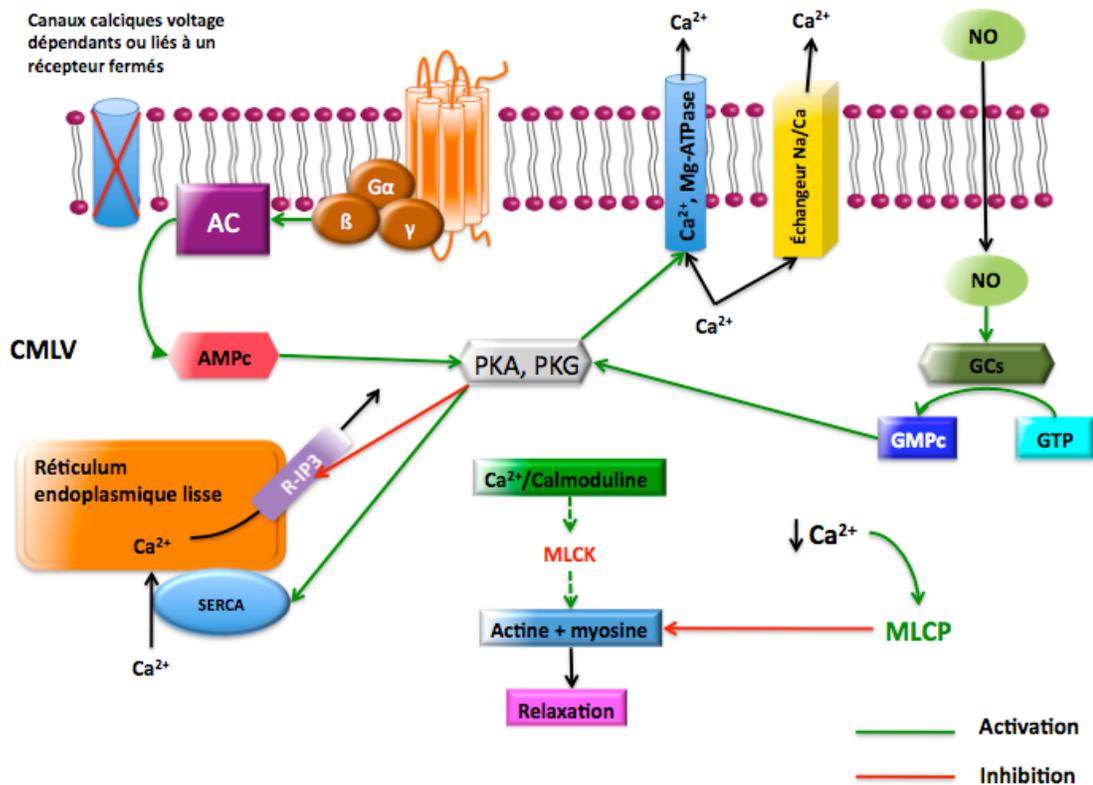


R-IP3 : Récepteurs canaux sensibles à l'IP3.

Les mécanismes associés à la diminution de la concentration intracellulaire de Ca²⁺, donc à la relaxation des CMLVs, sont nombreux. Ils impliquent le réticulum endoplasmique lisse (REL) et la membrane plasmique. Le recaptage du Ca²⁺ au niveau du REL se fait via des Ca²⁺-ATPases, les SERCA (*Sarco/Endoplasmic Calcium ATPase*). Elles nécessitent la présence de Mg²⁺ pour leur activation et permettent la translocation de deux Ca²⁺ vers la lumière du REL pour chaque ATP hydrolysé²¹. Au niveau des CMLVs, ce recaptage implique les SERCA2b et 2a²². La membrane plasmique possède également

une Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase. Elle dispose en plus d'échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La relaxation peut aussi se produire lorsqu'on empêche l'entrée du calcium dans la cellule soit en bloquant les canaux calciques voltage dépendants ou en inhibant les récepteurs à l' IP_3 ¹⁹ (Figure 2).

Figure 2 : Mécanismes de relaxation des CMLVs



AMPc : adénosine monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase A, PKG : protéine kinase G, NO : monoxyde d'azote, GCs : guanylate cyclase soluble, GTP : guanosine triphosphate.

Par ces mécanismes de contraction-relaxation, les CMLVs peuvent réguler le débit sanguin local et la pression artérielle.

C. Fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules fusiformes avec de longues et fines expansions qui vont rejoindre celles des fibroblastes voisins. Ils sont responsables de la synthèse d'une grande partie de la matrice extracellulaire pendant le développement. Ils sont également essentiels au maintien de l'intégrité des tissus de soutien par le renouvellement lent mais permanent des constituants de la matrice extracellulaire. Ils sont impliqués dans l'apoptose et la prolifération de même que la migration vers l'espace sous-endothélial lors de lésions vasculaires. Ils sont donc essentiels à la cicatrisation des tissus^{1, 16, 23}. Les fibroblastes se différencient en proto-myofibroblastes au site de la lésion dans le processus de cicatrisation. Ce sont les forces de traction entre les fibroblastes et la matrice extracellulaire environnante visant à refermer la lésion qui induisent ce changement phénotypique. Les proto-myofibroblastes sont capables de se contracter et expriment l' α -actine. Ces cellules vont ensuite se différencier en myofibroblastes en réponse à différents facteurs comme le TGF- β 1 (*transforming growth factor beta*), la fibronectine (FN) et la tension mécanique. Les myofibroblastes, qui expriment également l' α -actine, vont générer de plus grandes forces de contraction et être présents dans la phase tardive de la fermeture de la lésion, avant de disparaître par apoptose^{24, 25}.

1.1.2. Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau structuré et complexe de macromolécules sécrétées et d'enzymes protéolytiques. Elle fournit une charpente structurale et protectrice qui rend possible l'organisation et les propriétés physiques des vaisseaux. Elle régule la disponibilité de facteurs de croissance qui, en interagissant avec des récepteurs de la surface cellulaire, vont influencer l'activité des cellules de façon à gérer les événements tant développementaux qu'homéostatiques²⁶⁻²⁸. C'est donc dire qu'elle entoure les cellules qui la synthétisent et module leur phénotype. La synthèse de la

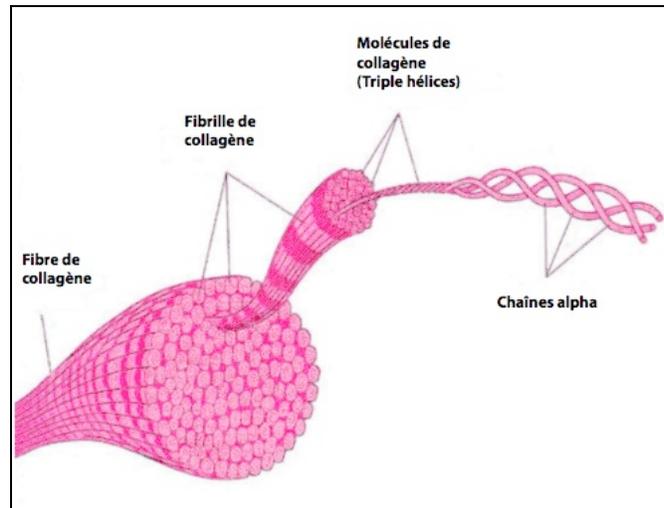
MEC est élevée durant le développement. À l'âge adulte la synthèse est plus lente, voire inexistante.

A. Composantes structurales

a. Collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante du règne animal et représente 30% des protéines totales chez l'humain. Il s'agit d'une molécule trimérique composée de trois chaînes polypeptidiques α , contenant typiquement la séquence répétée $(G-X-Y)_n$, X étant plus souvent qu'autrement la proline et Y l'hydroxyproline. Ce sont ces séquences répétées qui permettent l'organisation en triple hélices du collagène, qui lui confère non seulement une structure, mais également d'importantes interactions biologiques²⁹. Le collagène est une composante majeure de la matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins, où il est responsable de l'intégrité et de la résilience, soit la robustesse et la résistance à l'étirement. Ces propriétés dépendent à leur tour de la composition, ainsi que du diamètre de la fibre de collagène³⁰ (Figure 3). Par ailleurs, le collagène est également impliqué dans la différenciation, l'adhésion, la migration, la prolifération et l'apoptose cellulaires. On compte aujourd'hui 27 types de collagène, dont 90% sont représentés par les types I, II et III³¹. Le précurseur du collagène est le pro-collagène³², synthétisé par les CMLVs, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages. Des 27 types de collagène, 13 sont retrouvés dans les vaisseaux sanguins, soit les collagènes I, III, IV, V, VI, VII, VIII, XIII, XIV, XV, XVI, XVIII et XIX. La synthèse des différents types de collagène est affectée par une multitude de facteurs. Parmi ceux-ci, on dénombre l'acide ascorbique, les protéoglycans, le glucose, les facteurs de croissance, le calcium et l'estrogène³¹. De plus, ils peuvent être subdivisés en trois groupes : les collagènes fibrillaires, les collagènes non-fibrillaires et les collagènes fabriquant des réseaux³³.

Figure 3 : Représentation d'une fibre de collagène



Adapté de ³⁴.

i. Collagènes fibrillaires

Les collagènes I et III, synthétisés par les CMLVs, les cellules endothéliales et les fibroblastes^{33, 35, 36}, sont les collagènes fibrillaires les plus abondants au niveau vasculaire, représentant respectivement 60% et 30% des collagènes vasculaires. Ce sont eux qui sont responsables de la force de tension et de la résilience élastique des fibres de collagène³³. Les 10% restant sont représentés par le collagène de type V. Le rôle exact du collagène V n'est pas connu, mais il pourrait agir comme noyau de structure des fibrilles³⁷. Les collagènes fibrillaires sont caractérisés par un domaine à triple hélice et des domaines terminaux globuleux, les propeptides N et C. Ces derniers ne possèdent pas de séquence répétée Gly-X-Y³⁸. Ils sont d'abord synthétisés sous forme de précurseur, le pro-collagène, qui est assisté par différentes chaperones, dont HSP27³⁹, BiP⁴⁰, GRP94⁴¹ et SPARC⁴², pour permettre un repliement et une trimérisation appropriés, au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. Les interventions d'enzymes, notamment la peptidylproline cis-trans isomérase et la prolyl-4-hydrolase, sont également nécessaires au repliement et à la propagation de la triple hélice. Une fois sécrétée dans l'espace extracellulaire, la triple

hélice de collagène subit le clivage de ces extrémités globulaires propeptidiques N et C par des procollagen-N et -C protéinases⁴³. Par la suite, les triple hélices s'assemblent spontanément de façon parallèle en fibrilles striées recoupées où chaque molécule est décalée environ du quart de la longueur de son voisin le plus rapproché³⁵. Ce phénomène se manifeste pas l'alternance de chevauchements et d'interstices de triple hélices et est dépendant de la fibronectine⁴⁴. Les fibrilles ainsi formées sont hétérotypiques, c'est-à-dire constituées de différents types de collagène. Au fur et à mesure que d'autres fibres de collagène sont ajoutées à la fibrille, celle-ci augmente de diamètre et se renforce. La matrice de collagène est également solidifiée par la formation de liaisons covalentes intra- et inter-moléculaires par une enzyme appelée lysyl oxydase⁴⁵.

ii. Collagènes non-fibrillaires

Les collagènes non-fibrillaires sont moins abondants dans la paroi vasculaire. Ils ne forment pas de fibrilles eux-mêmes, d'où leur nom, mais participeraient néanmoins à la formation des fibrilles de collagène³⁵. Pour se faire, ils vont se lier à la surface des fibrilles en formation. Ils comprennent les collagènes FACIT (*fibril-associated collagens with interrupted triple helices*). Ces derniers sont représentés, au niveau de la paroi, par les collagènes de type XIV et XVI. Les collagènes non-fibrillaires sont constitués de trois régions fonctionnelles. La première comprend une ou deux triple hélice(s) permettant l'interaction et l'adhésion aux fibrilles. La seconde, qui possède une autre triple hélice, sert de bras rigide se projetant à l'extérieur de la fibrille. La troisième région, qui ne contient pas de triple hélice, interagit avec d'autres molécules de la matrice et avec les cellules⁴⁶. Les collagènes XIV et XVI sont associés aux fibrilles de collagène de type I⁴⁷. Le collagène de type VII, présent au niveau de la membrane basale, dans l'espace sous-endothélial, agit comme molécule d'ancrage. Il permet de renforcer l'attachement entre les cellules endothéliales et la matrice sous-jacente⁴⁸. Le collagène de type XIII, exprimé au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales, ferait l'adhésion entre les cellules et la matrice environnante et pourrait également agir comme récepteur de ligands solubles dans

la matrice⁴⁹. Les collagènes de type XV, XVIII et XIX sont des éléments structuraux de la membrane basale des vaisseaux sanguins. Leurs rôles précis demeurent à ce jour inconnus.

iii. Collagènes formant des réseaux

Les collagènes IV, VI et VIII sont les collagènes formant des réseaux présents au niveau de la paroi vasculaire. Ces collagènes s'assemblent de façon spontanée en formant des structures s'apparentant à des filets, où les monomères s'associent en C-terminal pour former des dimères et en N-terminal pour former des tétramères³⁵. Le collagène de type IV est la composante structurale la plus importante de la membrane basale. Il comporte trois domaines. Un domaine N-terminal 7S, un domaine C-terminal globulaire et une triple hélice centrale contenant des interruptions aux motifs répétés Gly-X-Y, ce qui la rend flexible. Son assemblage nécessite des interactions latérales entre les triple hélices. Ainsi, dans le domaine 7S en N-terminal, quatre triple hélices de quatre molécules différentes s'assemblent en conformation tête-bêche, ce qui engendre une structure dite « araignée »⁴⁶. En plus d'agir comme principal élément de structure, d'autres fonctions sont prêtées au collagène de type IV. Entre autres, il est impliqué dans l'activation des plaquettes et dans l'adhésion cellulaire^{50, 51}. Le collagène de type VI est constitué de trois chaînes polypeptidiques assemblées en hétérotrimère. Il contient une courte triple hélice et des domaines terminaux globulaires. Il contient également 11 séquences arginine-glycine-aspartate (RGD), suggérant une liaison avec des récepteurs de type intégrines. Les molécules de collagène VI s'assemblent en dimères dans l'orientation tête-bêche. Deux dimères s'assemblent en tétramères qui forment ensuite des agrégats qui sont décrits comme des filaments en « perles ». Ces agrégats sont stabilisés par des ponts disulfures⁴⁶. Bien qu'il soit ubiquitaire, on le retrouve principalement dans l'espace sous-endothélial. Le collagène VI peut lier les collagènes I et IV, l'héparine et le facteur von-Willebrand. De plus, il est impliqué dans l'adhésion des plaquettes et des CMLVs de même que l'activation des plaquettes. Il joue également un rôle dans les interactions entre l'élastine et les CMLVs en formant un pont entre les deux⁵². Le troisième membre de ce groupe de collagènes est

celui de type VIII. Il contient un domaine collagène de 454 acides aminés, une région carboxy-terminale sans triple hélice NC1 et une région N-terminale sans triple hélice NC2. Il contient également une courte triple hélice. Il est sécrété par les cellules endothéliales⁵³. Il possède une structure en bâtonnet, avec deux extrémités en forme de minuscules globes. Dans la paroi vasculaire, il est exprimé par les cellules endothéliales, les CMLVs et les macrophages. Son expression est augmentée par le PDGF⁵⁴ (*platelet derived growth factor*), l'angiotensine II⁵⁵, bFGF (*basic fibroblast growth factor*) et le TGF- β ⁵⁶ et est diminuée par l'interferon- γ ⁵⁷.

b. Fibres élastiques

Les fibres élastiques constituent un assemblage insoluble de molécules de la matrice extracellulaire, organisées en lamelles concentriques dans la paroi des vaisseaux. Elles procurent l'élasticité aux vaisseaux sanguins, c'est-à-dire une flexibilité et une extensibilité, tout en permettant leur rétraction⁵⁸. Cette propriété des vaisseaux les rend capables de tamponner les variations de pressions engendrées par le cycle cardiaque pour générer un débit relativement constant. D'autre part, les fibres élastiques contrôlent l'activité du TGF- β et régulent la migration, la survie et la différenciation cellulaires. L'élastine représente 90% de la composition des fibres élastiques, les autres étant des glycoprotéines microfibrillaires comme les fibrillines et les glycoprotéines associées au microfibrilles²⁷.

i. Élastine

Il s'agit d'une protéine insoluble, amorphe, hydrophobe et fortement réticulée. Le précurseur de l'élastine est la tropoélastine, une protéine soluble de 72-kDa synthétisée principalement par les CMLVs, mais également par les fibroblastes et les cellules endothéliales⁵⁹. La tropoélastine est encodée par un seul gène localisé sur le chromosome 7 chez l'humain. Après épissage alternatif, l'ARNm est traduit en plusieurs isoformes, qui ont toutes des régions hydrophobes alternant avec des domaines réticulaires hydrophiles.

Les séquences hydrophobes sont responsables de l'élasticité et sont formées de séquences répétitives riches en valine et en glycine⁶⁰. L'élastine mature est formée de plusieurs molécules de tropoélastine liées de façon covalente par des réticulations de nature bi- (lysinonorleucine), tri- (merodesmosine) ou tétra-fonctionnelles (desmosine et isodesmosine)⁶¹. L'expression de l'élastine est contrôlée, entre autres, au niveau transcriptionnel par l'*insulin-like growth factor* (IGF), et au niveau post-transcriptionnel par le TGF- β (Tableau 1). L'élastine mature a une demie-vie de 40 ans, ce qui en fait la protéine la plus durable de la matrice extracellulaire et lui permet de subsister, dans des conditions optimales, pendant toute la vie de son hôte^{62, 63}.

Tableau 1 : Facteurs régulant la synthèse d'élastine in vitro

Inhibiteurs	Stimuli
5-Bromodeoxyuridine	TGF- β
Acide ascorbique	<i>Insulin-like growth factor I</i>
<i>Basic fibroblast growth factor</i>	<i>Fetal calf serum</i>
AMP cyclique	Étirement mécanique
Hydrocortisone (cellule adulte)	Hydrocortisone (cellule foetale)
Vieillessement in vitro	GMP cyclique
Monensine	5-Deoxyazacytidine
Adapté de ⁶⁰	

ii. Fibrilline

Les microfibrilles sont des filaments facilitant l'assemblage de l'élastine et procurant la structure aux fibres élastiques en formation. Les fibrillines constituent les principaux éléments des microfibrilles associées aux fibres élastiques. Ce sont de grosses protéines d'environ 350kDa en forme de bâtonnet. Leur structure primaire comporte plusieurs domaines *calcium binding epidermal growth factor like* (cbEGF) intercalés entre sept domaines 8-cystéine⁶⁴. La fibrilline-1 possède un patron d'expression semblable à l'élastine dans l'aorte, et constitue l'isoforme la plus abondante tout au long de la vie. De son côté, la fibrilline-2 est fortement exprimée dans les tissus en développement, puis décline de façon linéaire une fois la maturation atteinte⁶⁵. L'expression de la fibrilline-2, même à son niveau le plus élevé, est largement inférieure à celle de l'élastine et de la fibrilline-1. Les fibrillines seraient essentielles à l'assemblage des fibres élastiques, même si on ignore toujours le moment précis de leur participation au processus^{66, 67}. Cependant, l'apparition de la fibrilline des millions d'années avant l'élastine dans l'évolution suggère fortement que son rôle ne soit pas limité à l'assemblage de cette dernière⁶⁸. En effet, la fibrilline possède entre autres des séquences RGD (Arg-Glyc-Asp) interagissant avec les intégrines, ce qui suggère qu'elle pourrait être impliquée directement dans la signalisation cellulaire via ces récepteurs^{69, 70}. La fibrilline peut également réguler l'activité et la signalisation du TGF- β . D'ailleurs, une suractivation du TGF- β est associée à des mutations de la fibrilline, et entraîne certaines fibrillinopathies, telle que le Syndrome de Marfan⁷¹. Ce dernier se caractérise par un assemblage défectueux des microfibrilles, et donc des fibres élastiques, qui peut mener à l'anévrisme et à la dissection aortiques et entraîner la mort. Par ailleurs, des mutations du gène de la fibrilline-1 sont également associées à d'autres pathologies vasculaires qui s'apparentent au Syndrome de Marfan, notamment : l'anévrisme et la dissection de l'aorte ascendante, le phénotype MASS (*mitral valve prolapse, aortic valve delation without dissection, skeletal and skin abnormalities*) et le Syndrome de Shprintzen-Goldberg (prolapsus de la valve mitrale, insuffisance mitrale et insuffisance aortique)⁶⁵.

iii. Glycoprotéines associées aux microfibrilles

Les glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGPs) sont de petites protéines microfibrillaires de 20kDa. On retrouve deux membres des MAGP, soit MAGP-1 et MAGP-2. Les deux participeraient à l'assemblage de l'élastine, bien que leur rôle précis demeure incertain. MAGP-1 est également la seule protéine, avec la fibrilline, à être une composante constitutive des microfibrilles. Elle peut se lier à la tropoélastine, la fibrilline-1 et la fibrilline-2⁷². Il a donc été suggéré qu'elle pourrait faire le pont entre la fibrilline et la tropoélastine dans l'assemblage des fibres élastiques. Cependant, l'inactivation de MAGP-1 chez la souris n'a pas produit d'effet sur la structure ou la quantité d'élastine présente au niveau des vaisseaux ou d'autres tissus comportant de l'élastine⁷³. MAGP-2 peut également se lier aux fibrillines -1 et -2 et est spécifiquement associée aux microfibrilles contenant la fibrilline. Elle possède un motif RGD permettant de se lier à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, mais ce dernier ne serait pas impliqué dans l'assemblage des fibres élastiques. MAGP-2 ciblerait plutôt le transfert de la tropoélastine de la membrane cellulaire vers les fibres élastiques en développement⁷⁴.

iv. Fibulines

La famille des fibulines comporte 7 membres. Elles se retrouvent toutes, à l'exception des fibulines -6 et -7, dans les tissus élastiques. Les fibulines sont des protéines de 50-200kDa qui comportent une série de domaines *EGF-like* suivis par un domaine carboxy-terminal *fibulin-like*^{75, 76}. La fibuline-5, exprimée par les CMLVs et les cellules endothéliales, induit l'adhésion cellulaire via sa liaison avec des intégrines. Elle est également impliquée dans la prolifération et la migration des CMLVs, en plus de réguler la fibrillogénèse de l'élastine. La fibuline-4 est également requise pour la formation des fibres élastiques. L'inactivation des fibulines -4 et -5 chez la souris entraîne la formation de fibres élastiques désorganisées au niveau des vaisseaux sanguins et est même létale dans le cas de la fibuline-4^{77, 78}. L'inactivation des fibulines -1, -2 et -3 est sans conséquence sur les gros

vaisseaux élastiques. Cependant, la perte de la fibuline-1 est létale chez la souris, entraînant des saignements associés à une perte de l'intégrité de la membrane basale dans les petits vaisseaux⁷⁹⁻⁸¹.

v. EMILIN-1

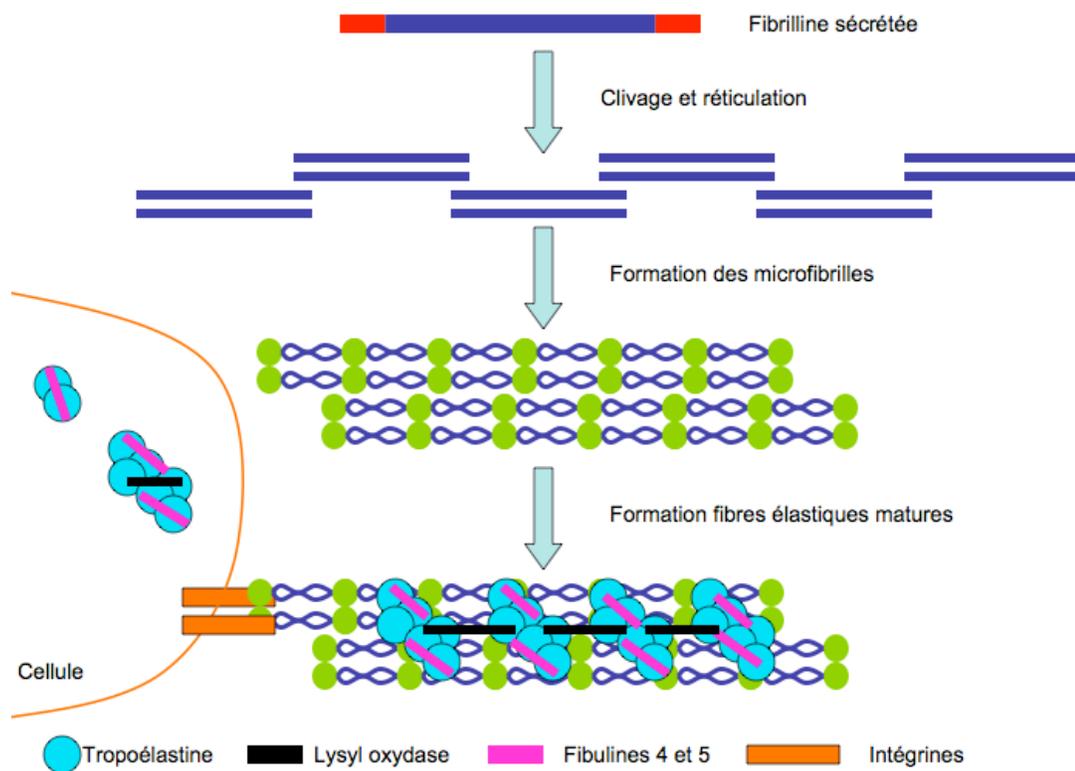
L'EMILIN-1 (*elastin microfibril interface located protein*) se trouve à l'interface entre le noyau amorphe de l'élastine et les microfibrilles. Son rôle dans l'assemblage des fibres élastiques est encore méconnu, mais sa capacité à lier la tropoélastine et la fibuline-5 suggère qu'elle pourrait faire le pont entre ces deux molécules⁸². L'absence d'EMILIN-1 chez la souris est associée à une hypertension et à des lamelles élastiques irrégulières, de même qu'à des parois vasculaires amincies et des diamètres réduits au niveau des artères⁸³. Elle est également associée à une augmentation de l'activité de TGF- β .

vi. Élastogénèse

L'élastogénèse débute par l'assemblage des microfibrilles (Figure 4). Les molécules de fibrillines sécrétées sont clivées en C- et N- terminal par des enzymes de la famille des furine/PACE⁸⁴. Il s'agit d'un prérequis à l'alignement directionnel de l'accrétion moléculaire et aux interactions latérales. Les monomères de fibrilline s'amalgament à proximité des cellules pour former des microfibrilles avec la participation d'intégrines et de protéoglycans héparan sulfate. Les microfibrilles sont ensuite stabilisées par la transglutaminase⁸⁵ et vont s'empaqueter et former une charpente pour supporter la déposition de tropoélastine. Cette dernière nécessite une chaperone, l'*elastin binding protein* (EBP) pour migrer à travers les différentes voies sécrétoires intracellulaires⁸⁶. Cette chaperone prévient l'agrégation prématurée de la tropoélastine. Une fois sur les microfibrilles, l'EBP relâche la tropoélastine qui se liera de façon ordonnée à ces dernières. Les molécules de tropoélastine vont alors s'assembler et s'orienter de façon ordonnée, processus appelé coascervation⁵⁹. Par la suite, la lysyl oxydase, une enzyme Cu²⁺-dépendante, va stabiliser et polymériser la tropoélastine en produit insoluble, l'élastine. Des

agrégats d'élastine sont ainsi formés sur les microfibrilles, les fibuline-4 et -5 facilitant ce processus. La réticulation subséquente des agrégats par la lysyl oxydase permet de former une fibre élastique complète⁷². La synthèse de fibres élastiques est limitée à la vie foetale et à la période néonatale. L'expression des protéines associées à la formation de fibres élastiques diminue ensuite à des niveaux très bas, qui persisteront durant la vie adulte⁶⁶.

Figure 4 : Représentation de l'élastogénèse



Adapté de^{60, 65, 72}

B. Autres composantes

i. Protéoglycans

Les protéoglycans représentent des protéines provenant de différentes familles de gènes contenant des chaînes de glycosaminoglycans (GAG) liées de façon covalente. Les chaînes sont généralement attachées par des liens O-glycosidiques aux résidus sérines présents au cœur de la protéine protéoglycane. Le type de GAG attachés aux protéoglycans permet de catégoriser ces derniers. Il y a d'abord le chondroitin sulfate et le dermatan sulfate, qui consistent en une répétition d'un disaccharide de galactosamine et d'un acide glucuronique ou iduronique. Ensuite, l'héparine et l'héparan sulfate, constitués d'une répétition d'un disaccharide de glucosamine et d'un acide glucuronique ou iduronique. Finalement, le keratan sulfate, qui consiste en une répétition d'un disaccharide de glucosamine et de galactose⁶⁸. Les protéoglycans sont capables d'interagir avec d'autres molécules de la matrice extracellulaire, en plus de participer à son assemblage. De plus, ils confèrent différentes propriétés aux tissus, comme l'hydratation et la filtration. L'hydratation est due aux glycosaminoglycans, qui, étant chargés négativement, sont capables de lier plusieurs molécules d'eau. Au niveau cellulaire, ils peuvent réguler différentes activités, telles que la prolifération, la différenciation, l'adhésion et la migration. Ils sont également impliqués dans la rétention lipidique et le développement de l'athérosclérose⁸⁷⁻⁹⁰. Par ailleurs, l'expression de certains protéoglycans serait accrue chez les rats hypertendus⁹¹⁻⁹³. Finalement, ils contrôlent la biodisponibilité et la stabilité de certaines cytokines²⁷.

Le versican, plus gros protéoglycan de la paroi vasculaire, est localisé dans les régions endothéliale et mediale. Ce protéoglycan induit l'adhésion cellulaire, la prolifération et module la migration cellulaire⁹⁴. Son niveau d'expression est inversement proportionnel à celui de l'élastine. En effet, l'assemblage de l'élastine serait inhibé par le chondroitin sulfate du GAG de la molécule de versican. Par ailleurs, le versican serait également impliqué dans l'athérosclérose⁹⁵.

L'aggreccan est exprimé dans la partie externe de l'aorte en développement. Son niveau d'expression est largement inférieur à celui du versican. Sa fonction dans la paroi vasculaire n'a pas été élucidée à ce jour⁹⁶.

Les SLRPs (*small leucine-rich proteoglycans*) sont une famille de protéoglycans qui lient certaines molécules de la matrice extracellulaire, dont le collagène, la tropoélastine, la fibronectine, le TGF- β et les microfibrilles contenant la fibrilline. Parmi les SLRPs, on retrouve le biglycan et la décorine, qui lient le collagène et régulent sa fibrillogénèse. La décorine se retrouve dans l'adventice de la paroi vasculaire, tandis que le biglycan est présent dans toutes les régions de la paroi et joue un rôle important dans la rétention lipidique⁹⁷, en plus d'induire la production de cytokine inflammatoire en se liant aux récepteur Toll-like 2 et 4⁹⁸. Il participe également à la sténose aortique⁸⁷. Les autres SLRPs de la paroi vasculaire sont la fibromoduline, l'ostéoglycine et le lumican⁹⁹.

Les syndecans sont une famille de protéoglycans transmembranaires comprenant 4 membres : syndecan-1, -2 (fibroglycan), -3 et -4. Ils contiennent un court domaine extracellulaire qui lie 3 à 5 chaînes d'heparan sulfate ou de chondroitin sulfate. Ils ont également un court domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique comportant deux régions invariables (C1 et C2) et une région variable (V)¹⁰⁰. Les chaînes de GAG médient l'interaction entre certains facteurs de croissance et leurs récepteurs. Elles régulent également la liaison à différentes protéines extracellulaires, comme la fibronectine et la laminine. Le domaine cytoplasmique serait impliqué dans la migration des cellules endothéliales¹⁰¹. Par ailleurs, les syndecans-1, -3 et -4 seraient impliquées dans l'angiogenèse¹⁰.

Le perlecan, localisé dans la membrane basale, est un gros protéoglycan liant 3 à 4 chaînes d'heparan sulfate. Le cœur de la molécule comporte 5 modules, la rendant capable de lier plusieurs protéines de la matrice extracellulaire, notamment la laminine-1, le collagène de type IV, le nidogène et la fibronectine, ainsi que plusieurs facteurs de croissance tel que le PDGF¹⁰². Il peut également se lier aux LDL et contribuerait à l'athérosclérose¹⁰.

ii. Fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine sécrétée en dimère, dont les chaînes de 230-270kDa sont jointes par des ponts disulfures en C terminal. Elle contient trois types de modules répétitifs : type I, type II et type III. On compte 12 modules de type I, 2 modules de types 2, et 15 à 17 de type III, qui constituent ensemble 90% de la séquence de la fibronectine. Les différentes séries de modules forment à leur tour les domaines de la protéine. Ce sont ces différents domaines qui sont responsables de la liaison au collagène, aux cellules, à l'héparine, aux intégrines, aux GAGs, à la fibrine et à la fibronectine elle-même¹⁰³. Le module de type III contient également la séquence RGD permettant la liaison aux intégrines. La fibronectine participe à de nombreuses interactions avec différents constituants de la matrice extracellulaire, en plus de jouer un rôle dans la migration, la croissance et la différenciation cellulaires¹⁰⁴. Elle joue aussi le rôle de matrice provisoire dans le processus de cicatrisation¹⁰⁵.

La fibronectine est organisée en réseau fibrillaire via l'interaction avec des récepteurs de surface cellulaire. L'assemblage de la fibronectine est un processus cellule-dépendant qui nécessite son activation. Une fois sécrétés, les dimères de la fibronectine se lient à des intégrines, principalement l' $\alpha_5\beta_1$, qui vont l'associer au cytosquelette d'actine et entraîner son activation en induisant un changement de conformation. La fibronectine passe ainsi d'une conformation compacte à une conformation étendue, où les domaines de liaison à la fibronectine sont exposés. Cette activation permet d'induire l'association FN-FN et la formation de fibrilles. Initialement courtes et solubles, les fibrilles se prolongent de la cellule aux substrats à proximité ou entre les cellules adjacentes. Cependant, davantage de FN s'accumule à la surface, rendant les fibrilles graduellement insolubles aux détergents et formant des molécules multimériques à haut poids moléculaire. Ceci implique la formation de ponts disulfures induits par l'isomérase disulfure intrinsèque de la FN et par des interactions protéine-protéine très stables^{103, 106}.

iii. Laminines

Les laminines constituent une famille de 12 glycoprotéines hétérotrimériques, principalement localisées au niveau de la membrane basale. Elles y ont d'importantes fonctions dans le développement et le maintien de l'organisation cellulaire et de la structure supramoléculaire. Elles sont impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaires, en plus de posséder certaines fonctions de signalisation. Dans la membrane basale, les laminines forment la base architecturale, avec le collagène de type IV, les nidogènes (entactines) et les protéoglycans. Les intégrines β_1 et β_4 , le dystroglycan et l'héparan sulfate agissent comme les principaux récepteurs aux laminines¹⁰⁷. Leur structure comporte trois chaînes polypeptidiques : α , β et γ . Ensemble, elles forment la structure en forme de croix des laminines, avec trois bras courts et un long. Jusqu'à maintenant, cinq chaînes α , trois chaînes β et trois chaînes γ ont été décrites. Leurs différentes combinaisons constituent les différentes isoformes de laminines¹⁰⁸. Les vaisseaux sanguins expriment les chaînes α_4 , α_5 , β_1 et γ_1 , ce qui correspond aux laminines 8 et 10. De plus, ces isoformes sont produites par les cellules endothéliales^{109, 110}. Elles ont également un domaine globulaire à l'extrémité de chacun des bras qui permet les interactions avec d'autres molécules ou laminines.

iv. Nidogènes

Les nidogènes, ou entactines, forment, tel que mentionné dans la section précédente, une des quatre composantes majeures de la membrane basale. Ce sont des glycoprotéines de 150kDa comportant une chaîne sulfatée, avec trois domaines globulaires séparés par un domaine en forme de bâtonnet contenant des séquences EGF répétées. Elles peuvent ainsi former des complexes serrés avec les laminines, le collagène de type IV et le perlecan¹¹¹. On retrouve deux isoformes de nidogène (1 et 2), encodés par des gènes distincts.

v. Thrombospondines

Les thrombospondines (TSP) sont une famille de glycoprotéines modulaires sécrétées. La famille est divisée en deux sous-groupes. TSP1 et TSP2, qui forment un premier sous-groupe, ont un poids moléculaire de 145kDa. TSP3, TSP4 et TSP5 représentent le deuxième sous-groupe, et ont un poids moléculaire de 100kDa¹¹². Nous discuterons principalement de TSP1 et TSP2. Ce sont des molécules qui ne contribuent pas directement à l'intégrité d'une entité physique, telle qu'une fibre. Elles agissent plutôt de façon contextuelle pour influencer la fonction cellulaire en modulant les interactions cellule-matrice. Les TSP font partie d'un groupe de protéines dites « matricellulaires ». Elles sont définies comme des protéines extracellulaires dont les fonctions sont atteintes en se liant à des protéines matricielles, des récepteurs à la surface cellulaire, des cytokines ou des protéases qui interagissent à leur tour avec la surface cellulaire¹¹³. Les autres membres de ce groupe sont la famille des tenascines, SPARC/ostéonectine et l'ostéopontine. Elles ont également été appelées protéines anti-adhésives par le passé¹¹⁴. Les fonctions anti-adhésives de ces protéines entraîneraient le détachement des cellules pour faciliter la migration. Cependant, les mécanismes associés à ces fonctions sont encore nébuleux. Par ailleurs, les protéines matricellulaires sont principalement exprimées durant le développement, la croissance et en réponse à une lésion. Chez l'adulte, leur expression est faible, sauf dans les tissus qui sont en renouvellement constant, comme les os. Dans le cas des TSP, elles réduisent les adhésions focales des cellules endothéliales et des fibroblastes¹¹⁵. TSP1 et TSP2 sont également impliquées dans le processus de cicatrisation. En effet, en bloquant TSP1 dans un modèle de cicatrisation, il a été montré que la réparation de la lésion et la réorganisation du tissu étaient retardées¹¹⁶. De plus, chez la souris TSP1 KO, il y a une déficience dans la conversion du TGF- β 1 latent en TGF- β 1 actif, suggérant que TSP1 active TGF- β 1¹¹⁷. Les TSP peuvent également réguler certaines protéines qui contrôlent l'activation de l'angiogénèse¹¹⁸, notamment le collagène de type I, et participent à l'agrégation plaquettaire¹¹⁹.

vi. SPARC/ostéonectine

SPARC (*secreted protein acidic rich in cystein*), aussi appelée ostéonectine, est une composante acide et riche en cystéines de la matrice extracellulaire. Elle est modulée à la hausse par la fibronectine et le TGF- β ¹²⁰. Sa capacité à lier le collagène de type I, l'hydroxyapatite et le Ca²⁺ suggère un rôle dans la minéralisation¹²¹. Or, bien que les CMLVs expriment fortement SPARC dans les tissus sains, l'expression est réduite, voir absente dans la sclérose de Mönckerberg¹²². Il semblerait donc que SPARC protège contre la calcification vasculaire. En tant que protéine matricellulaire, SPARC a des propriétés anti-adhésives au niveau d'interactions cellule-matrice, en plus de réguler les métalloprotéinases matricielles et l'interaction de facteurs de croissance avec leur récepteur. Elle peut également inhiber la progression du cycle cellulaire en phases G1 et S. Par ailleurs, la dégradation de SPARC par certaines protéases, notamment MMP-3, produirait des peptides qui stimulent l'angiogénèse¹²³⁻¹²⁵. Finalement, tel que mentionné auparavant, SPARC agirait comme protéine chaperone dans la synthèse du collagène⁴².

vii. Ténascines

Les ténascines sont une famille de glycoprotéines qui comporte quatre membres : ténascine C, ténascine R, ténascine X et ténascine W. Elles sont synthétisées par les cellules de la matrice extracellulaire. Les ténascines ont des séquences répétées heptad et EGF-*like*, des domaines de fibronectine de type III et un domaine C-terminal globulaire. En N-terminal se trouve un domaine d'oligomérisation qui mène à la formation d'hexamères dans le cas des ténascines C et W et de trimères pour la ténascine R. La ténascine X forme également des oligomères¹²⁶. En tant que protéines matricellulaires, les ténascines vont réguler l'adhésion et la migration cellulaires. La ténascine C peut également inhiber l'activité de la *focal adhesion kinase* (FAK) et de RhoA, deux molécules capables d'influencer le cytosquelette d'actine¹²⁷.

viii. Vitronectine

La vitronectine est une glycoprotéine d'adhésion multifonctionnelle retrouvée dans la circulation et différents tissus, notamment dans la peau, les reins et les vaisseaux sanguins. Les CMLVs synthétisent la vitronectine¹²⁸. Elle possède des sites de liaison aux intégrines, collagènes, à l'héparine et aux composantes du système du complément. Elle contient trois sites de glycosylation, des sites potentiels de sulfatation et de phosphorylation post-traductionnels et un site de réticulation par la transglutaminase. Elle possède également la séquence RGD lui permettant de se lier aux intégrines. La vitronectine est impliquée dans l'adhésion cellulaire où elle sert, entre autres, de lien moléculaire entre les fibres élastiques et la charpente de collagène environnante. Elle participe aussi à la défense immunitaire et l'hémostase¹²⁹.

ix. TGF- β

Les cytokines de la superfamille du TGF- β incluent près de 30 protéines, dont les TGF- β , les activines et les inhibines, la myostatine, les *bone morphogenic proteins* (BMPs), les *growth/differentiation factors* (GDFs), nodal et l'hormone anti-Müllerian. Tous les membres de cette superfamille sont des protéines dimériques avec des structures conservées et impliquées dans une pléthore de fonctions¹³⁰. Cependant, pour les fins de cette thèse, nous nous limiterons aux TGF- β .

La famille du TGF- β comprend trois isoformes : TGF- β 1, - β 2 et - β 3, qui sont encodées par différents gènes ayant 60-80% d'homologie. Le TGF- β 1 est exprimé au niveau vasculaire par les cellules endothéliales, les CMLVs et les fibroblastes. Le TGF- β 2 est exprimé par les cellules épithéliales et les neurones alors que le TGF β 3 est exprimé par les cellules mésenchymateuses¹³¹. Les TGF- β sont synthétisés sous forme de précurseurs latents liés de façon non covalente à un propeptide, le *latent-associated peptide* (LAP), pour former un complexe nommé le *small latent complex* (SLC). Ce dernier se lie ensuite à une des trois *latent TGF- β binding proteins* (LTBP-1, -3 et -4) pour former le *large latent complex* (LLC). Le LLC est ensuite sécrété dans la matrice où il est stocké, en s'associant

de façon covalente via son extrémité N terminale, à des protéines. L'activation du TGF- β nécessite le clivage de sa région N terminale, laquelle est liée à la LTBP. Différentes protéines peuvent activer le TGF- β , notamment les métalloprotéinases matricielles (MMP) 2 et 9, la thrombospondine-1 et l'intégrine $\alpha_v\beta_6$. D'autres stimuli, comme un pH extrême, la chaleur, l'interaction avec des stéroïdes ou les dérivés réactifs de l'oxygène sont également impliqués dans l'activation du TGF- β ^{131, 132}.

Une fois activé, il peut se lier à des intégrines ou à son récepteur à la surface cellulaire. Il existe trois récepteurs au TGF- β : TGF β R1, TGF β R2 et TGF β R3. Le TGF- β se lie d'abord au TGF β R2, qui est soit seul ou associé au TGF β R3. Suite à la liaison, TGF β R2 recrute TGF β R1 pour former un complexe dont l'activité sérine-thréonine kinase intracellulaire initie la cascade de signalisation des Smads. Il s'agit de la voie de signalisation canonique du TGF β . Les Smads sont une famille de 8 activateurs transcriptionnels subdivisée en 3 groupes : les Smads activées par le récepteur (R-Smads : Smad1, 2, 3, 5 et 8), le médiateur commun Smad (Co-Smad : Smad4) et les Smads inhibitrices (I-Smads : Smad6 et 7). Une fois complexé avec le TGF β R2, TGF β R1 induit la phosphorylation des R-Smads. Les R-Smads phosphorylées interagissent avec Smad4, ce qui entraîne leur translocation au noyau, et l'induction de la transcription de gènes cibles¹³³. Au niveau vasculaire, TGF- β 1 induit ainsi l'expression d'intégrines, de la fibronectine, des collagènes type I, IV et V et du *plasminogen activator inhibitor* (PAI)¹³⁴ (Figure 5). Les Smads inhibitrices viennent contrecarrer l'activation de TGF- β en prévenant la phosphorylation des R-Smads¹³⁵. D'autres facteurs, comme le *connective tissue growth factor* (CTGF), peuvent amplifier la réponse au TGF- β ¹³⁶.

Le TGF- β peut également induire une signalisation indépendante des Smads. C'est de cette façon que TGF- β peut activer Erk, JNK/p38, les GTPases *Rho-like* et PI3K/Akt¹³⁷. Il s'agit de voies non canoniques de signalisation du TGF- β .

Figure 5 : Signalisation canonique du TGF- β

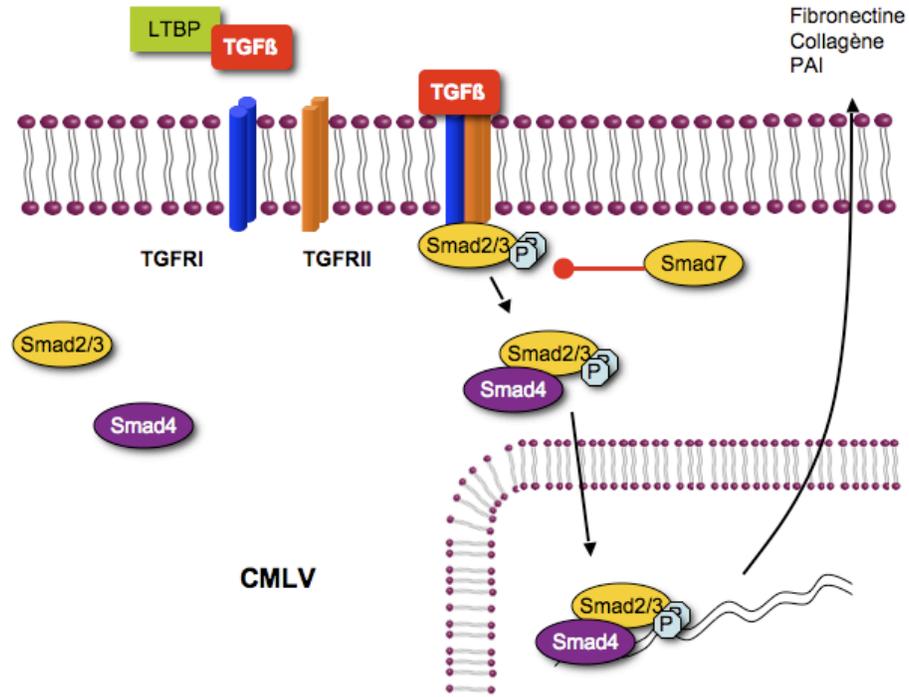


Tableau 2 : Principales composantes structurales de la matrice extracellulaire vasculaire

Composantes structurales	Rôle(s)
Collagène	Intégrité et résilience (robustesse et résistance à l'étirement) des vaisseaux, différenciation, adhésion, migration, prolifération et apoptose cellulaires
<i>Collagènes fibrillaires</i>	I et III : force de tension et résilience des fibres de collagène V : rôle inconnu
<i>Collagènes non-fibrillaires</i>	XIV et XVI (FACIT) : association et formation des fibrilles de collagène de type I VII : Molécule d'ancrage dans la membrane basale XIII : Adhésion entre les cellules endothéliales et matrice environnante XV, XVIII et XIX : éléments structuraux de la membrane basale, rôle précis inconnu
<i>Collagènes formant des réseaux</i>	IV : Principal élément de structure de la membrane basale, activation plaquettaire, adhésion cellulaire VI : Impliqué dans l'adhésion des plaquettes de des CMLVs, activation plaquettaire VIII : Composante de la membrane basale
Fibres élastiques	Élasticité (flexion et extension) et rétraction des vaisseaux sanguins, régulent l'activité du TGF-b, migration, survie et différenciation cellulaires
<i>Élastine</i>	Composante majeure (90%) des fibres élastiques
<i>Fibrilline</i>	Assemblage des fibres élastiques, régulation du TGF-b
<i>Glycoprotéines associées aux microfibrilles</i>	Assemblage de l'élastine
<i>Fibulines</i>	Adhésion, prolifération, migration cellulaires, formation des fibres élastiques, intégrité de la membrane basale
<i>EMILIN-1</i>	Assemblage des fibres élastiques
Autres composantes	
<i>Protéoglycans</i>	Assemblage de la matrice extracellulaire, hydratation et filtration tissulaires, rétention lipidique, prolifération, adhésion et migration cellulaires, contrôlent biodisponibilité et stabilité de cytokines
<i>Fibronectine</i>	Migration, croissance et différenciation cellulaires, cicatrisation
<i>Laminines</i>	Développement et organisation de la structure de la membrane basale, adhésion et migration cellulaires, signalisation
<i>Nidogène</i>	Composante majeure de la membrane basale
<i>Thrombospondines</i>	Influencent fonction cellulaire en modulant les interactions cellule-matrice, migration cellulaire, cicatrisation, activation du TGF-b, angiogenèse, agrégation plaquettaire
<i>SPARC/ostéonectine</i>	Régule interaction de facteurs de croissance avec récepteur, régule les métalloprotéinases matricielles, inhibition cycle cellulaire, synthèse du collagène
<i>Ténascines</i>	Adhésion et migration cellulaires
<i>Vitronectine</i>	Adhésion cellulaire, défense immunitaire, hémostasie

C. Stabilisation de la matrice extracellulaire

La modification post-traductionnelle de protéines, via la formation de liaisons covalentes ou réticulations, est essentielle à plusieurs processus biologiques. Il s'agit, entre autres, d'un phénomène indispensable à la coagulation sanguine et à la formation de la barrière épithéliale. La matrice extracellulaire n'y échappe pas, puisque ce processus stabilise sa structure et lui confère une résistance à la dégradation. Ces réticulations sont notamment requises dans l'assemblage des fibrilles de collagène et d'élastine, tel que décrit dans les sections précédentes.

a. Lysyl oxydase

Les lysyl oxydases représentent une famille de 5 enzymes possédant une activité amine oxydase cuivre dépendante catalysant la réticulation de l'élastine et du collagène. Outre la lysyl oxydase canonique (LOX), les fonctions des quatre autres enzymes identifiées (LOX1-4) n'ont toujours pas été élucidées¹³⁸.

LOX est synthétisée par les cellules fibrogéniques comme les CMLVs et les fibroblastes, de même que par les cellules endothéliales. L'enzyme est sécrétée sous forme de pro-enzyme inactive dans l'espace extracellulaire, où elle est clivée par une métalloprotéinase¹³⁹, identifiée récemment comme étant une pro-collagène C-protéinase (*bone morphogenic protein-1*)¹⁴⁰. Ce clivage, entre la glycine 132 et l'asparagine 163 de LOX, entraîne son activation. La présence d'un atome de cuivre au site actif¹⁴¹, de même que d'un groupement lysyl tyrosyl quinone¹⁴²(LTQ) sont également requis pour l'activité catalytique de l'enzyme. Ce dernier groupement agit comme cofacteur carbonyle et proviendrait de l'hydroxylation et l'oxydation autocatalytiques de la tyrosine 349, favorisées par l'atome de cuivre¹⁴³. Le cycle catalytique de l'enzyme activée fait intervenir

un mécanisme de cinétique « ping pong » qui a lieu en deux temps. Dans un premier temps, l'amine du substrat s'attache au site actif de l'enzyme via la liaison d'une base de Schiff avec le cofacteur LTQ. Le substrat est ainsi oxydé en aldéhyde, alors que le cofacteur est réduit en quinol. Le groupement aldéhyde est ensuite retiré du cofacteur par hydrolyse, laissant un groupe amine attaché à la quinone réduite pour former un aminoquinol. Dans un deuxième temps, l'aminquinol de l'enzyme est oxydé en quinoneimine, libérant un peroxyde d'hydrogène du site actif. Finalement, un produit d'ammoniac est libéré par l'hydrolyse de la quinoneimine, ce qui régénère le cofacteur LTQ à son état initial et complète le cycle catalytique¹⁴⁴.

Par ailleurs, l'aldéhyde libéré lors de la première moitié de la réaction se condense avec le groupe amine au sein d'une lysine environnante pour former une liaison covalente anhydrolysinonorleucine (deLNL). Deux résidus aldéhydes peuvent également réagir ensemble pour former une liaison covalente adol. Ces deux formes de réticulations sont présentes dans le collagène et l'élastine¹⁴⁵.

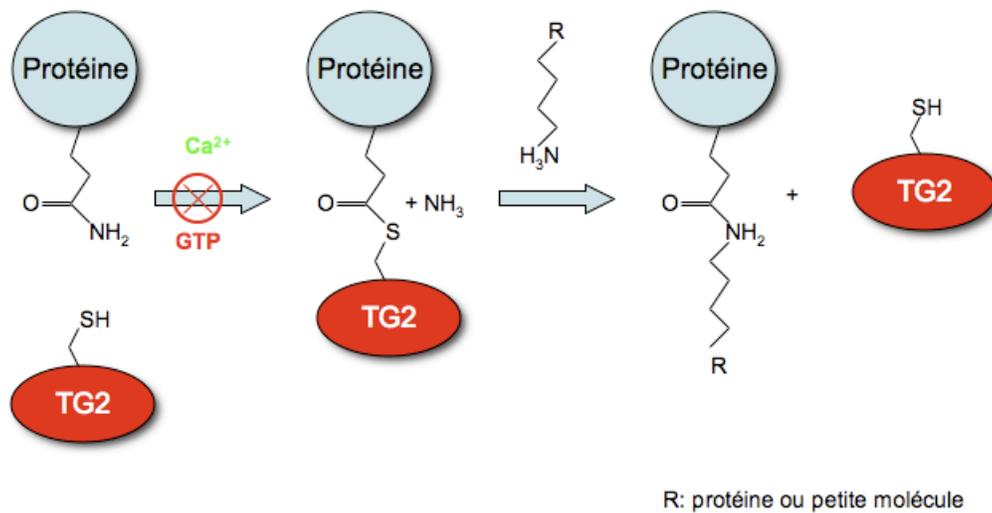
L'expression de LOX est modulée par plusieurs facteurs, comme les cytokines et les facteurs de croissance. Différents états physiologiques peuvent également influencer son expression, tels que la croissance, la cicatrisation, le vieillissement, un métabolisme du cuivre altéré, une tumeur et certaines maladies génétiques¹⁴⁶.

b. Transglutaminases

Les transglutaminases (TG) sont une famille d'enzymes calcium dépendantes catalysant la formation de liaisons covalentes entre protéines par une réaction de transfert d'acyl. Celle-ci se fait entre le groupe γ -carboxamide d'une glutamine et le groupe ϵ -amine d'une lysine, formant un lien isopeptidique ϵ -(γ -glutamyl)lysine¹⁴⁷ (Figure 6). La première étape dans cette réaction est l'acylation de la cystéine du site actif de la TG par la glutamine d'une protéine. Il en résulte la libération d'ammoniac et la formation d'un intermédiaire thioester. Cet intermédiaire est ensuite attaqué par une amine ϵ du résidu lysine d'une

protéine pour former le lien isopeptidique¹⁴⁸. Les liens ainsi formés confèrent une résistance mécanique, chimique et protéolytique aux agrégats protéiques qui les contiennent¹⁴⁹.

Figure 6 : Formation de liaisons covalentes par la transglutaminase



Adapté de ¹⁴⁸.

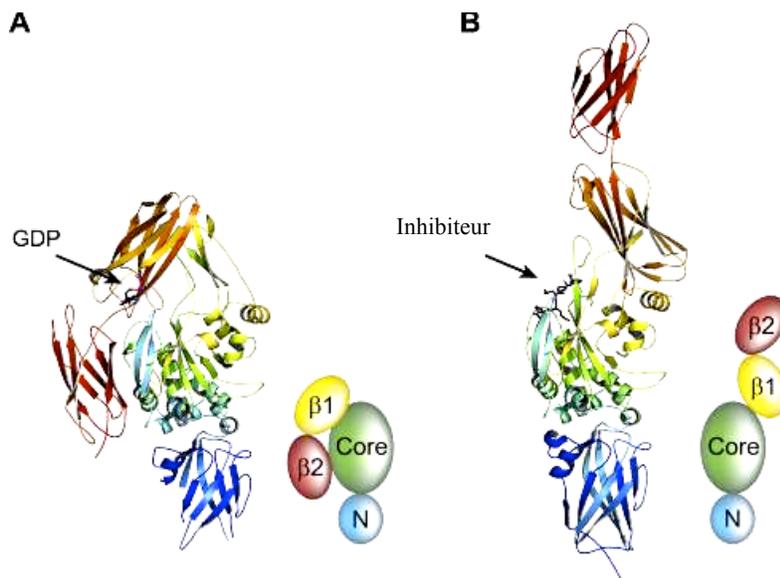
Les TG démontrent une grande spécificité pour les substrats protéiques glutaminiques. Cependant, la spécificité pour le groupement amine de la protéine acceptrice d'acyl est faible¹⁵⁰. Chez les mammifères, huit transglutaminases provenant de gènes différents ont été observées : facteur XIII A, TG1, TG2 ou transglutaminase tissulaire (tTG), TG3, TG4, TG5, TG6 et TG7. Cependant, TG6 et TG7 n'ont pas encore été caractérisées. Toutes les TG font partie de la superfamille des cystéines protéases *papain-like* et ont des cibles de réticulation différentes. Elles possèdent également toutes la triade catalytique Cys-His-Asp ou Cys-His-Asn¹⁵⁰.

La TG2 est le membre de la famille des transglutaminases le plus étudié. Sa structure, conservée entre les différentes transglutaminases, comprend quatre domaines. Le domaine N-terminal (domaine 1) contient le site de liaison à la fibronectine. Le domaine catalytique (domaine 2) formé d'hélices α et de feuillets β intercalés contient le site de liaison aux substrats et la triade catalytique. Le troisième domaine, contient le site de liaison au GTP et les sites d'interaction au récepteur α_{1B} adrénergique. Le domaine C-terminal (domaine 4) comprend le site d'interaction à la phospholipase C δ 1¹⁴⁸.

L'activité enzymatique de la TG2 est influencée par la conformation qu'adopte ses différents domaines, en modulant la réactivité du site catalytique et son accessibilité à différents substrats¹⁵⁰. En conditions de repos, le domaine catalytique est caché par la superposition des domaines 3 et 4. Lorsque le calcium se lie à l'hélice α terminale du domaine 2, les domaines 3 et 4 s'éloignent du site catalytique en formant un angle de 180°, donnant à la protéine une forme de bâtonnet¹⁴⁸. L'accès au site actif est alors établi et permet la liaison d'un substrat (Figure 7). Plusieurs substrats ont été identifiés à ce jour. Le tableau 3 représente les principaux. L'activation par le calcium peut être contre-carrée par les inhibiteurs allostérique GTP (guanosine triphosphate) et GDP (guanosine diphosphate). Ces dernier se lient à la lysine 173 et entraîne l'inhibition réversible de la TG2. L'inhibition par le GTP est limitée aux conditions d'activation sous-optimales par le calcium et implique : 1) une modulation de l'affinité de liaison au calcium; 2) l'interférence avec les changements conformationnels engendrés par le calcium; 3) l'altération de la flexibilité des domaines et 4) le renforcement de l'interaction entre les domaines prévenant l'accès au site actif¹⁵¹. Un autre inhibiteur réversible de la TG2 est le zinc, qui va compétitionner avec le calcium pour le même site de liaison. L'activité de la TG2 est également bloquée par des inhibiteurs aminés compétitifs. Ils vont compétitionner avec les substrats aminés naturels de l'enzyme pour se lier au site catalytique. Ainsi, l'activité enzymatique de la TG2 se poursuit en présence de l'inhibiteur compétitif, mais la formation de liens isopeptidiques se fera entre le substrat naturel contenant la glutamine et l'amine de l'inhibiteur compétitif plutôt qu'avec un substrat aminé naturel¹⁴⁸. Parmi les inhibiteurs compétitifs, il y a la

putrescine, le monodansylcadaverine et la cystamine. La 3^e catégorie d'inhibiteurs de transglutaminase est celle des inhibiteurs irréversibles. Ces derniers vont modifier l'enzyme de façon covalente, empêchant la liaison à un substrat. Les inhibiteurs de la famille du substrat carbobenzyloxy-L-glutaminyglycine (Cbz-gln-gly), où le groupe fonctionnel gln est remplacé par différents groupes fonctionnels réactifs¹⁵², tels que les chloracétamides, sont parmi les inhibiteurs irréversibles. Par ailleurs, la TG2 est également inhibée par le SNP (*sodium nitroprusside*), un donneur de NO (monoxyde d'azote), par nitrosylation¹⁵³.

Figure 7 : Conformations inactive (A) et active (B) de la TG2



Le domaine N-terminal (N, domaine 1) est en bleu, le domaine catalytique (domaine 2, Core) en vert, le domaine 3 (β1) en jaune et le domaine C-terminal (β2, domaine 4) en rouge. A) Conformation repliée de l'enzyme inactive, où le GDP est lié au domaine 3 qui, avec le domaine 4, empêche l'accès du substrat au site actif. B) Conformation en batônet (active) de la TG2. Le site catalytique est accessible à un substrat ou, dans le cas présent, un inhibiteur irréversible, le Ac-P(DON)LPF-NH₂.

Adapté de ¹⁵⁴.

La TG2 est localisée dans trois compartiments cellulaires majeurs : le cytosol, le noyau et la membrane plasmique. Elle est également présente au niveau de la matrice extracellulaire. Elle est exprimée, entre autres, par les cellules endothéliales et les CMLVs au niveau des vaisseaux sanguins¹⁵⁵. De plus, même si elle ne possède pas de peptide signal facilitant son exportation à la surface cellulaire par la voie classique du réticulum endoplasmique/Golgi, l'enzyme est sécrétée de façon contrôlée. Le FXIIIA est une autre transglutaminase sécrétée de cette façon¹⁵⁶. Pour être sécrétée, différents critères doivent être remplis : un site de liaison à la fibronectine en N-terminal; un lien peptidique à la tyrosine 274 et une cystéine 277 intacte au site actif^{157, 158}. Une fois sécrétée dans la matrice extracellulaire, la TG2 forme un complexe avec plusieurs protéines, dont la fibronectine et le collagène de type I, et induit leur réticulation, de façon à stabiliser la matrice extracellulaire. Au niveau osseux, TG2 stabilise une matrice riche en collagène I, glycoprotéines et protéoglycans, facilitant le processus de minéralisation, bien qu'elle puisse également y participer indépendamment de son activité catalytique¹⁵⁹.

Par ailleurs, l'activité de la TG2 ne se limite pas à stabiliser les protéines en augmentant leur résistance chimique, protéolytique et mécanique. En effet, elle permet par exemples, de faciliter l'adhésion et la motilité cellulaires^{157, 160} en interagissant avec les intégrines β_1 et β_3 , et en agissant comme co-récepteur de la fibronectine¹⁶¹. Elle est également essentielle au remodelage des petites artères¹⁶². De plus, en formant un complexe avec les intégrines et la fibronectine, la TG2 agit comme co-récepteur d'adhésion cellulaire et peut transmettre des signaux du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire en activant les voies de signalisation de RhoA/ROCK¹⁶³ et FAK¹⁶⁴. Ces fonctions seraient indépendantes de l'activité de réticulation de la TG2. Elle joue également un rôle dans la mort cellulaire. Or, il y a beaucoup de controverse à ce sujet puisque certaines études ont montré un rôle pro-apoptotique, alors que d'autres démontrent plutôt une implication anti-apoptotique¹⁶⁵. Cependant, la facilitation de la clairance des cellules mortes par phagocytose semble faire l'unanimité¹⁶⁶. Finalement, la TG2 posséderait également des activités disulfure-isomérase¹⁶⁷ et protéine kinase¹⁶⁸, mais ces observations n'ont jamais été confirmées.

La demi-vie de la TG2 est d'environ 11h¹⁶⁹. La quantité d'enzyme présente dans le tissu est régulée au niveau de la transcription par des cytokines (Ex : TGF- β ¹⁷⁰, interleukine 6, TNF- α) des rétinoïdes, la thrombine, la vitamine D et les hormones stéroïdes¹⁷¹⁻¹⁷⁴. Toute situation de stress cellulaire ou de lésion tissulaire induira également l'augmentation de la sécrétion de la TG2. La fonction de cicatrisation de la TG2 est induite dans ces conditions¹⁰⁵. Différents mécanismes ont été identifiés comme étant responsables de la régulation de la TG2. L'enzyme à la surface cellulaire peut ainsi être dégradée par des métalloprotéinases matricielles¹⁷⁵. Elle peut également être internalisée, puis dégradée via la voie endolysosomale, dans un processus dépendant du récepteur LRP1 (*lipoprotein associated receptor 1*), un membre de la superfamille des récepteurs au LDL¹⁷⁶. Cependant, les mécanismes de régulation de la TG2 restent encore peu connus.

Tableau 3 : Principaux substrats de la transglutaminase 2

Substrats endogènes				
Protéines cytosoliques	Protéines du cytosquelette	Protéines d'organelles	Protéines extracellulaires	Protéines signalitiques
Aldolase A	Actine	Histone H2B	Collagène	Substance P
Glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase	Myosine Troponine	a-oxoglutarate déhydrogénase	Fibronectine Fibrinogène	Phospholipase A2 Midkine
Phosphorylase kinase	β-tubuline	Cytochromes	Vitronectine	
Crystallines	Tau	Erythrocyte band III	Ostéopontine	
Gluthatione S-transférase	Rho A	CD38	Nidogène	
		Acétylcholine estérase	Laminine	
			LTBP-1	
			Ostéonectine	
			Ostéocalcine	
Substrats exogènes				
Protéines alimentaires	Protéines de levure	Protéines virales		
Gliadine du blé	Protéines de surface de candida albicans	gp120 et gp41		
Protéines de lactosérum		HIV aspartyl protéinase		
Protéines de soja		Hepatitis C virus core protein		
Pea legumin				
Adapté de ¹⁵⁰ .				

D. Déstabilisation de la matrice extracellulaire

Le génome typique contient 2-4% de gènes encodant des enzymes protéolytiques ou protéases. On dénombre plus de 66 000 protéases, dont 699 chez l'homme^{177,178}. Ces enzymes sont capables de dégrader la matrice extracellulaire, ce qui est essentiel à son assemblage, son remodelage et à sa réparation. Elles sont également impliquées dans différents processus physiopathologiques comme le cancer, les maladies inflammatoires chroniques et certaines pathologies cardiovasculaires¹⁷⁹. Pour accomplir leurs tâches, ces enzymes hydrolysent les liaisons peptidiques, modifiant de façon irréversible leur substrat protéique. Cette dégradation, bien souvent spécifique et ciblée plutôt que totale, permet aux protéases de modifier la signalisation et la fonction des cellules. Certains substrats sont activés, d'autres inactivés ou peuvent subir une modification de leurs fonctions par protéolyse. Sans ces enzymes, la matrice extracellulaire serait un environnement inerte¹⁸⁰.

Les protéases sont classées en deux grandes catégories. Les endopeptidases clivent les régions internes des chaînes peptidiques, tandis que les exopeptidases agissent au niveau des extrémités peptidiques, ou près de celles-ci, ce qui libère un résidu composé d'un ou plusieurs acides aminés. Les endopeptidases représentent les principales enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire. Elles peuvent être sous-catégorisées selon leur mécanisme de clivage et leur site actif. Il existe donc 6 familles d'endopeptidases¹⁸¹ :

- Les endopeptidases aspartiques
- Les sérines endopeptidases
- Les métallo-endopeptidases
- Les cystéines endopeptidases
- Les thréonines endopeptidases
- Les endopeptidases au mécanisme catalytique inconnu

Parmi celles-ci, les métallo-endopeptidases, les sérines peptidases et les cystéines endopeptidases sont les seules à agir au niveau extracellulaires. Les sections suivantes de cette thèse se consacreront donc à la description de ces dernières.

a. Métallo-endopeptidases

Également nommées les métalloprotéinases, ces enzymes sont caractérisées par une activité catalytique dépendante de la présence d'un atome métallique, normalement le zinc, au site actif¹⁸². Les endopeptidases zinc dépendantes, ou zincines, possèdent un site de liaison au zinc constitué des acides aminés histidine-glutamate-X-X-histidine (HEXXH) où X peut être n'importe quel acide aminé. Les deux résidus histidine sont impliqués dans la liaison de l'ion zinc, tandis que le glutamate permettrait de polariser une molécule d'eau liée au zinc pour induire une attaque nucléophile au niveau d'un lien peptidique du substrat¹⁸³. Un important sous-groupe de zincines, les metzincines, possède une séquence de liaison au zinc plus étendue, soit HEXXHXXGXXH où G représente la glycine. Il existe également d'autres familles de zincines, dont les gluzincines et les inverzincines¹⁸⁴. Cependant, seule la famille des metzincines sera abordée dans cette thèse. Elle porte ce nom en raison du résidu méthionine localisé près du site de liaison à l'ion zinc et de ses trois résidus histidine. Elle comprend cinq membres :

- Les métalloprotéinases matricielles ou matrixines
- Les adamalysines ou reprotolysines
- Les pappalysines
- Les serralysines
- Les astacines

Cette classification est établie en fonction de la séquence des acides aminés qui constituent le site de liaison du zinc (HEXXHXXGXXH)¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

i. Les astacines

Le nom de cette famille provient de leur prototype structural, l'astacine, l'enzyme collagénolytique majeure du système digestif de l'écrevisse *Astacus astacus L.*¹⁸⁸. Les autres membres d'origine des astacines sont la *human bone morphogenic protein 1* (BMP-1 ou *procollagen C-proteinase*), les méprines α et β et UVS.2¹⁸⁹. Depuis, plus de 120 séquences ont été identifiées dans plusieurs espèces différentes, allant de la bactérie aux mammifères. Six membres de cette famille (M12) sont exprimés chez l'humain, selon la base de données MEROPS des peptidases. Il s'agit des méprines α et β , de BMP-1, des mammalian tolloid-like protein 1 et 2 ainsi que de l'ovastacine¹⁷⁸. Ces enzymes participent à différents processus biologiques comme le remodelage et la différenciation tissulaires de même que la digestion. Pour y arriver, elles induisent l'activation de facteurs de croissance ou la dégradation de protéines ou de la matrice extracellulaire elle-même. La formation osseuse et la biosynthèse du collagène sont deux mécanismes auxquels participent les astacines. Les BMP-1 sont particulièrement actives chez l'humain, où elles assurent la maturation protéolytique des collagènes I, II, III, V, VII, XI, de la prolyl oxydase, de la laminine 5, des protéines SIBLING (*small integrin binding ligand, N-linked glycoprotein*), de la lysyl oxydase et des SLRPs¹⁹⁰.

ii. Les serralysines

Les serralysines sont des facteurs de virulence sécrétés par différentes bactéries Gram-négatives, dont *Serratia marcescens*, d'où leur nom provient. Elles seraient responsables de certaines maladies infectieuses comme la méningite, la pyélonéphrite, la mélioidose et la pneumonie. Elles ciblent certains facteurs de coagulation, ou des protéines impliquées dans la défense immunitaire, ce qui peut entraîner un choc anaphylactique¹⁹¹.

iii. Les pappalysines

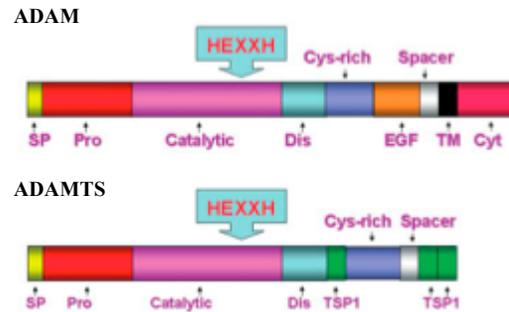
La famille des pappalysines comprend cinq membres selon la base de données MEROPS des peptidases : la metallopeptidase MEP1, la pappalysine-1, la pappalysine-2, l'ulilysine et la peptidase PoFE. Seules les pappalysines 1 et 2 sont présentes chez l'humain¹⁷⁸. Elles sont exprimées ou sécrétées, entre autres, par les fibroblastes, les ostéoblastes, de même que les CMLVs. Elles sont impliquées dans le clivage des *insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBP) en conditions physiologiques et pathologiques. Ceci entraîne l'activation de l'*insulin-like growth factor I* (IGF-I), un des médiateurs de l'athérosclérose qui stimule la migration des CMLVs et des cellules endothéliales, la chimiotaxie des monocytes et l'activation du TNF- α ^{192, 193}. De plus, elles sont fortement exprimées dans les plaques athéromateuses, ce qui refléterait l'instabilité de ces dernières¹⁹⁴. La pappalysine-1 peut également cliver l'*IGF-binding protein 4*, un inhibiteur d'IGF-I, ce qui augmenterait la disponibilité d'IGF-I. Par ailleurs, les IGF induisent l'expression de myogénine au niveau du muscle squelettique, de chaînes lourdes de myosine-beta au niveau cardiaque et d'élastine au niveau de l'aorte¹⁹⁵. Ils sont également impliqués dans l'angiogénèse.

iv. Les adamalysines

La famille des adamalysines, dont le nom provient de leur prototype structural, *Crotalus adamanteus snake venom adamalysin II*, comprend les ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*) aussi connues sous le nom des MDCs (*metalloprotease-like, disintegrin-like and cysteine-rich proteins*) et des reprolysines¹⁹¹. Ce sont des enzymes attachées à la membrane impliquées dans la fusion cellule-cellule, l'adhésion et la signalisation intracellulaire. Elles ont d'abord été identifiées grâce à leur rôle dans la fécondation, mais sont maintenant reconnues comme étant importantes à la dégradation de

la matrice extracellulaire et l'angiogénèse. Les ADAMs peuvent également induire la transactivation du récepteur à l'EGF (EGFR). En effet, elles peuvent cliver la portion extracellulaire de ligands du EGFR. Ces ligands, ainsi libérés de la cellule, peuvent se lier et activer l'EGFR et induire la signalisation intracellulaire¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Par ailleurs, un déficit en EGFR serait associé au développement de la sténose aortique¹⁹⁹. De plus, les ADAMs sont impliquées dans divers processus pathologiques, comme le cancer, l'inflammation, la neurodégénérescence et la fibrose²⁰⁰. Aujourd'hui, la famille des ADAMs comprend 40 gènes, dont 23 sont exprimés chez l'homme. La famille des ADAMTS (*ADAMs with thrombospondin domains*), comprenant 19 membres, est associée aux ADAMs, puisqu'elle possède des propriétés fonctionnelles et structurelles similaires, bien que distinctes, aux ADAMs²⁰¹. Ces dernières contiennent un pro-domaine, un domaine catalytique zinc métalloprotéase extracellulaire, un domaine disintegrin, une région riche en cystéine, une séquence *EGF-like* (*epidermal growth factor like*), un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique (Figure 8). Toutes les ADAMs ne sont pas actives. Elles sont en effet dépourvues d'activité si elles n'ont pas de domaine catalytique pouvant lier le zinc. Leurs fonctions sont d'ailleurs inconnues. Par ailleurs, les ADAMs sont apparentées aux métalloprotéinases matricielles (MMPs), ce qui fait en sorte que les inhibiteurs des MMPs bloquent également l'activité des ADAMs²⁰⁰. Pour sa part, la famille des ADAMTS se différencie des ADAMs par l'absence de séquences EGF-like et des domaines transmembranaires, faisant en sorte qu'elles agissent comme des protéines sécrétées. Elles ont également un ou plusieurs motifs thrombospondine en C-terminal. Les ADAMTS auraient un rôle important dans la maturation du collagène, de l'aggrécane et du facteur von Willebrand²⁰¹.

Figure 8 : Structure des domaines des ADAM et ADAMTS



Adapté de ²⁰⁰.

v. Métalloprotéinases matricielles

La famille des MMPs, ou matrixines, est composée d'au moins 24 endopeptidases dépendantes du zinc et fonctionnant à pH neutre. Parmi celles-ci, 14 sont exprimées au niveau des vaisseaux sanguins : MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16 et MMP-17²⁰². Les MMPs sont constituées d'un pro-domaine, d'un domaine catalytique, d'une région charnière et d'un domaine hémapexine. Le pro-domaine contient une cystéine qui se lie au site actif du domaine catalytique et maintient la MMP sous forme latente²⁰³. La région charnière est riche en proline et lie le domaine catalytique au domaine hémapexine C terminal. Ce dernier détermine la spécificité des MMPs pour leurs substrats et médie l'interaction avec les inhibiteurs endogènes²⁰⁴. En fonction de la spécificité aux substrats, de la similarité des séquences et de l'organisation des domaines, les MMPs sont subdivisées en six groupes : collagénases, gélatinases, stromélysines, matrilysines, MMPs de type membranaire et autres MMPs.

Les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18) sont les principales protéases sécrétées capables de dégrader les collagènes de type I, II, III, V et XI dans la matrice extracellulaire. Elles clivent le collagène entre la glycine 775 et la leucine 776 des

chaînes α . Ceci forme des produits se dénaturant rapidement pour former la gélatine, dégradée par d'autres MMPs, les gélatinases, et par les sérines protéases²⁰⁵.

Les gélatinases sont la MMP-2 et la MMP-9. Elles possèdent un domaine compact permettant de lier le collagène, et dégradent les types IV, V, VII, X, XI et XIV du collagène, en plus de l'élastine, de la fibronectine et de la fibrilline-1. MMP-2 dégrade en plus les collagènes de type I, II et III²⁰⁶. Elles jouent un rôle important dans la cicatrisation²⁰⁷.

Les stromélysines (MMP-3 et MMP-10) sont des enzymes dégradant les collagènes de type IV et IX, la laminine, la fibronectine, l'élastine, la fibrilline-1 et les protéoglycans²⁰³.

Les matrilysines (MMP-7 et MMP-26) sont caractérisées par l'absence d'un domaine hémopexine. Elles peuvent cliver le plasminogène, ce qui produit un inhibiteur de l'angiogénèse²⁰⁸.

Les MMPs de type membranaire (MT-MMP) (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24, MMP-17 et MMP-25) sont, comme leur nom l'indique, des protéines ancrées à la membrane ou des protéines transmembranaires. Elles peuvent toutes activer la pro-MMP-2 et dégrader plusieurs protéines de la matrice extracellulaire. Elles contiennent un site de clivage pour les furines protéinases, nécessaire à leur activation, entre le pro-domaine et le domaine catalytique. Elles sont activées avant leur sécrétion²⁰⁹.

Finalement, les autres MMPs regroupent : MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27 et MMP-28²¹⁰.

La plupart des MMPs sont sécrétées sous forme de pro-enzymes inactives ou précurseurs latents (zymogènes) ancrés à la surface cellulaire ou près de celle-ci dans la matrice extracellulaire. Elles demeurent sous cette forme latente par l'interaction entre la cystéine du pro-domaine et le site catalytique. Différentes molécules peuvent cliver cette liaison et activer les MMPs, parmi lesquelles on retrouve certaines protéinases extracellulaires, dont la plasmine et d'autres MMPs²¹¹. Différents agents chimiques peuvent

aussi activer les MMPs, comme le glutathione oxydé, le SDS (sodium dodécyl sulfate), les espèces réactives de l'oxygène et les agents chaotropiques. En outre, la chaleur et un pH bas mènent à l'activation des MMPs²⁰³.

L'activité des MMPs est régulée à plusieurs niveaux : transcription, synthèse et sécrétion de la pro-enzyme, activation post-traductionnelle de la pro-enzyme, interactions avec d'autres MMPs et avec des inhibiteurs de MMPs, les TIMPS (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*)²¹². Ces derniers sont des inhibiteurs endogènes des MMPs. Quatre d'entre eux ont été identifiés chez les vertébrés : TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4. Ils inhibent les MMPs via leur domaine N-terminal²¹³. Par ailleurs, d'autres inhibiteurs endogènes des MMPs existent, tels que le *tissue factor pathway inhibitor-2*, la protéine précurseur de la β -amyloïde, RECK (*reversion-inducing cystein-rich protein with kazal motifs*) et les α -macroglobulines²⁰⁷.

b. Les sérines endopeptidases

Les sérines protéases représentent un groupe diversifié d'enzymes comprenant plus de 26 000 membres, soit le tiers de toutes les peptidases, divisées en 40 familles et 13 clans¹⁷⁸. De plus, 178 des 699 protéases présentes chez l'homme sont des sérines protéases, dont 138 sont de la famille S1 comprenant la trypsine²¹⁴. Leur nom vient de la sérine nucléophile qui se trouve au site actif de l'enzyme, et qui attaque le groupe fonctionnel carbonyle sur le lien peptidique du substrat pour former un acyl intermédiaire¹⁷⁷. Cette activité nucléophile dépend à son tour d'une triade catalytique formée d'une asparagine, d'une histidine et d'une sérine²¹⁵. Les sérines protéases sont impliquées dans la digestion, la coagulation sanguine, la fibrinolyse, le développement, l'apoptose, la fécondation et la défense immunitaire²¹⁴. Plusieurs sérines endopeptidases sont présentes au niveau vasculaire. Entre autres, la plasmine, dont le précurseur est le plasminogène, requiert l'action de deux autres sérines protéases, l'*urokinase-type* (uPA) et le *tissue-type plasminogen activator* (tPA)¹⁷⁹. En plus d'être impliquée dans la fibrinolyse, la plasmine peut également dégrader des glycoprotéines de la matrice extracellulaire, la fibronectine, la

thrombospondine et le facteur von Willebrand²¹⁶. La plasmine peut aussi activer certaines MMPs²¹⁷.

c. Les cystéines endopeptidases

Les cystéines protéases sont subdivisées en trois familles d'enzymes : la famille apparentée à l'enzyme de conversion de l'interleukine 1 β (ICE), la famille des calpaïnes et la famille des papaïnes²¹⁸. Cette dernière famille est la plus nombreuse et comprend entre autres la papaïne et les cathepsines lysosomales B, C, F, H, K, L, O, S, V, W et X. Les cathepsines sont synthétisées sous forme de pré-pro-enzymes, qui forment des pro-cathepsines une fois le pré-peptide clivé au niveau du réticulum endoplasmique. Les pro-cathepsines sont ensuite activées par le clivage protéolytique du pro-peptide dans les environnements acides au niveau des lysosomes ou des endosomes tardifs. La plupart des cathepsines sont actives à pH acide et peu actives à pH neutre²¹⁹. En revanche, l'activité de la cathepsine S est optimale à pH neutre. Les cathepsines induisent le remodelage de la matrice extracellulaire, participent à l'inflammation et jouent un rôle dans l'apoptose²²⁰. Elles sont également impliquées dans plusieurs conditions physiologiques et pathologiques, y compris le cancer, le remodelage osseux et les maladies cardiovasculaires. Les différentes cathepsines ont des substrats spécifiques. Par exemple, les cathepsines B et L peuvent dégrader le collagène de type II, IX et XI. La cathepsine S peut dégrader l'élastine. Elle contribuerait ainsi à l'athérosclérose²²¹. La cathepsine K possède une puissante activité élastolytique à pH neutre, en plus d'être la plus puissante collagénase à pH acide²²². Cependant, des évidences récentes ont montré que la cathepsine V était une élastase plus puissante que la cathepsine K²²³. D'autres substrats des cathepsines sont la laminine, la fibronectine, et les protéoglycans²²⁴.

E. Matrikines

L'activité des différentes protéases de la matrice extracellulaire peut libérer des produits de dégradation sous forme de peptides ayant une activité biologique, les matrikines. Ces peptides peuvent se lier à des récepteurs sur la surface cellulaire et participer à divers processus : activation de voies de signalisation intracellulaires, adhésion cellulaire, migration, prolifération, synthèse protéique et apoptose²²⁵. La dégradation de l'élastine peut ainsi libérer différentes matrikines, dont le peptide Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly. Ce dernier peut, par exemple, inhiber l'activité élastase²²⁶. Certaines glycoprotéines de la matrice sont également source de matrikines. C'est le cas de la fibronectine, dont le domaine N-terminal peut induire l'expression de MMP-1²²⁷. La thrombospondine peut également générer différents peptides de dégradation qui peuvent participer à l'activation du TGF- β ²²⁸. Une autre source importante de matrikines est le collagène. En fait, des données expérimentales récentes montrent que la plupart des macromolécules de la matrice extracellulaire peuvent générer des matrikines²²⁵.

F. Récepteurs de la matrice extracellulaire

La communication entre les cellules de la matrice extracellulaire et leur environnement nécessite la participation de récepteurs. Certains protéoglycans héparan sulfate comme les syndécans peuvent agir comme co-récepteurs favorisant l'ancrage des composés de la matrice à la surface cellulaire²²⁹. Cependant, ils ne représentent pas des récepteurs majeurs au sein de la matrice et ne seront donc pas abordés dans cette section. Nous nous attarderons particulièrement aux intégrines, qui représentent la majorité des récepteurs de la matrice extracellulaire, de même qu'aux récepteurs à domaine discoïdine, au récepteur de l'élastine et de la laminine et aux dystroglycans.

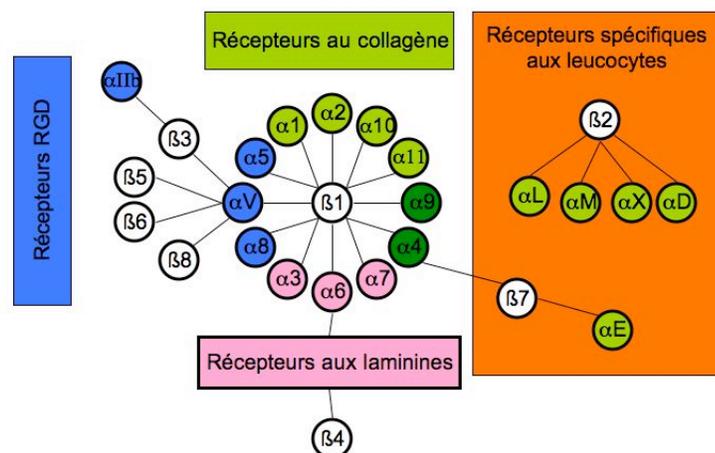
a. Les intégrines

Les intégrines sont une famille de récepteurs hétérodimériques transmembranaires de type I contenant deux sous-unités (α et β) liées de façon non-covalente. Elles participent à l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire et aux cellules environnantes, forment des connexions avec le cytosquelette et activent différentes voies de signalisation intracellulaires. Chez les mammifères, il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β formant 24 récepteurs différents. De ces 24 récepteurs, 16 ont été impliqués dans la biologie vasculaire²³⁰. Les sous-unités α et β contiennent chacune un domaine N-terminal extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire. La région N-terminale de la sous-unité α est composée de 7 segments d'environ 60 acides aminés²³¹. La moitié des sous-unités α contiennent également un domaine inséré (I), ou domaine du facteur von Willebrand (A) dans leur région extracellulaire. Lorsque présent, ce domaine est responsable de l'association aux ligands. En son absence, c'est la tête globulaire unissant les sous-unités α et β qui s'associe aux ligands²³². Dans les deux cas, la liaison est cation-dépendante²³⁰. La région N-terminale de la sous-unité β comprend une région PSI (*plexins, semaphorins and integrin*) riche en cystéine, qui garde l'intégrine en conformation inactive. Elle contient également quatre domaines EGF (*epidermal growth factor*) et une queue β constituée de deux feuillets β liés par des ponts disulfures. La région transmembranaire des sous-unités α et β est moins bien connue, mais contient une hélice, formée de 30 acides aminés, qui contrôlerait la signalisation bidirectionnelle des intégrines²³². La région C-terminal cytoplasmique des sous-unités α et β est relativement courte et ne contient, sauf dans le cas de la sous-unité β_4 , aucune activité enzymatique intrinsèque. Cependant, les intégrines peuvent activer différentes protéines intracellulaires, dont les FAK (*focal adhesion kinase*). Ces tyrosines kinases sont recrutées aux sites d'adhésions focales formés par le regroupement de plusieurs intégrines suite à leur liaison par des protéines matricielles. Des sites d'ancrage pour des tyrosines kinases de la famille des Src sont ainsi créés, produisant encore plus de sites d'ancrage pour d'autres protéines de signalisation²²⁹. Cette signalisation est de type externe-interne (*outside-in*), et représente

la majorité de la signalisation induite par les intégrines. La formation d'adhésions focales est également rendue possible grâce à des protéines d'ancrage intracellulaires, comme la taline, la β -actine et la filamine, qui sont attachées à la sous-unité α . Ces protéines font le lien entre la matrice extracellulaire et la cellule. Elles peuvent également relier des signaux intracellulaires vers le milieu extracellulaire. Ce type de signalisation est interne-externe (*inside-out*)²²⁹. Via ces deux types de signalisation, les intégrines sont impliquées dans différents processus, dont l'activation plaquettaire, la cicatrisation, l'inflammation, l'angiogenèse, l'apoptose et la mécano-transduction associée au contrôle du tonus vasculaire et à la réparation osseuse²³³⁻²³⁵.

Les intégrines peuvent être subdivisées en trois sous-groupes principaux. Le premier sous-groupe reconnaît la séquence de trois peptides, connue sous le nom de motif RGD (Arginine-Glycine-Aspartate), présente sur plusieurs molécules matricielles, dont la fibronectine. Un autre sous-groupe lie les laminines. Le troisième sous-groupe, dont certains membres sont uniques aux leucocytes, reconnaît le collagène. Ce dernier sous-groupe possède le domaine I²³⁶ (Figure 9).

Figure 9 : Sous-groupes d'intégrines



Adapté de ²³⁶

b. Récepteurs à domaine discoïdine

Les récepteurs à domaine discoïdine (DDR) font partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK). Ces derniers comportent normalement un domaine de liaison extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine catalytique tyrosine kinase. Or, le DDR, contrairement aux autres RTK, ne lie pas des facteurs de croissance solubles. Les DDR, dont le DDR1 et le DDR2 exprimés chez l'homme, vont plutôt lier les collagènes²³⁷. De plus, alors que les RTK sont normalement activés à leur niveau maximal en quelques minutes, le processus prend plusieurs heures pour les DDR²³⁸. Une autre distinction des DDR par rapport aux RTK vient de leur domaine discoïdine, long de 160 acides aminés, qui serait essentiel à la liaison du collagène²³⁹. Le DDR1 peut être activé par tous les collagènes testés jusqu'à maintenant. Le DDR2, pour sa part, est seulement activé par les collagènes fibrillaires, particulièrement les collagènes de type I et III²⁴⁰. Bien qu'aucun site de liaison au DDR n'ait été identifié au niveau du collagène, il semble que la structure en triple hélice soit requise. En effet, un collagène dénaturé sous forme de gélatine est incapable d'induire l'activité kinase²³⁷. DDR1 et DDR2 possèdent respectivement 15 et 13 résidus tyrosine au niveau cytoplasmique, qui servent de sites potentiels de phosphorylation une fois le récepteur activé par le collagène. Cette phosphorylation permettrait la liaison de molécules possédant des domaines *Src-homology-2* (*SH2*) et des domaines de liaison phosphotyrosine (PTB). L'activation des DDR peut mener à l'activation de différentes molécules, dont TRAF6, PI3K et Stat5²³⁷. Elle est également associée à un phénomène de « shedding ». Au cours de ce processus, le récepteur est clivé par des membres de la famille des ADAMs ou des MT-MMPs, ce qui résulte en une sous-unité β membranaire de 62kDa et une sous-unité α extracellulaire de 54kDa. Puisque la sous-unité β demeure phosphorylée suite au clivage, les voies de signalisation en aval resteraient activées. La sous-unité α , quant à elle, pourrait rester attachée au collagène et empêcher son interaction avec un autre récepteur entier. Elle pourrait également agir comme molécule de signalisation en liant d'autres protéines que le collagène sur des

cellules distantes de celles exprimant le DDR1. D'autres travaux sont requis afin d'évaluer ces deux possibilités²⁴¹. Par ailleurs, des études sur des souris déficientes en DDR1 ont montré que celles-ci étaient viables, bien que beaucoup plus petites que les souris témoins. Au niveau vasculaire, l'absence de DDR1 est associée à une déficience de la cicatrisation vasculaire, due à une diminution de la déposition de collagène et à un défaut dans la prolifération et la migration cellulaires. D'autres fonctions de DDR1 au niveau de la paroi incluent la synthèse de MMPs²⁴². L'activité des MMP-2 et MMP-9 est également réduite dans des cellules musculaires lisses provenant d'aortes de souris DDR1^{-/-}²⁴³.

c. Récepteur de l'élastine et de la laminine

Des peptides de dégradation, ou matrikines, peuvent provenir, tel que nous l'avons décrit précédemment, de l'action de différentes enzymes, dont les MMPs. Ces peptides peuvent également être produits chimiquement. Ceci correspond soit à un peptide formé synthétiquement ou à l'hydrolyse de l'élastine par différents produits chimiques. Par exemple, l'acide oxalique peut générer l' α -élastine (aE)²⁴⁴, alors que l'hydroxyde de potassium génère la κ -élastine (kE)²⁴⁵. Ces matrikines peuvent se lier au récepteur de l'élastine et de la laminine (ELR). Exprimé, entre autres, au niveau des fibroblastes et des cellules musculaires lisses vasculaires²⁴⁶, ce récepteur comprend trois sous-unités. La grosse sous-unité de 67kDa, l'*elastin binding protein* (EBP), est responsable de l'association au ligand. Les deux autres sous-unités, de 55kDa et 61kDa, associées à la membrane, interagiraient avec la neuraminidase (Nase) et la cathepsine A/protéine protectrice (PP), qui seraient essentielles à la transduction du signal²⁴⁵. En plus de lier la séquence VGVAPG sur l'élastine et ses peptides de dégradation, EBP peut aussi lier la laminine via la séquence LGTIPG de son domaine V et le collagène de type IV via son domaine 7S. L'EBP est également une protéine chaperone impliquée dans le transport intracellulaire de la tropoélastine. Elle protège la tropoélastine de la dégradation protéolytique et empêche son agrégation intracellulaire⁸⁶. Une fois à la surface cellulaire, la tropoélastine est sécrétée sous forme d'un complexe avec l'EBP. Les groupes fonctionnels

de certains sucres présents sur les microfibrilles vont ensuite se lier au site de liaison de la lectine, présent sur l'EBP, ce qui relâche la tropoélastine sur le réseau de microfibrilles. L'EBP est ensuite presque toujours internalisée par les endosomes²⁴⁷. L'EBP non internalisée peut former l'ELR dans la membrane ou s'associer de façon permanente aux fibres élastiques⁸⁶. L'ELR activé serait impliqué dans certains processus biologiques, comme la chimiotaxie, la prolifération cellulaire et la synthèse de protéases. Par ailleurs, bien que plusieurs voies de signalisation soient associées aux activités d'ELR, il y a beaucoup de controverse sur le sujet dans la littérature²⁴⁵.

d. Le dystroglycan

Le dystroglycan est une glycoprotéine transmembranaire hétérodimérique initialement isolée du *dystrophin-glycoprotein complex* (DGPC) au niveau musculaire. Ce dernier serait essentiel à la fonction des muscles en assurant la stabilité structurale du sarcolemme²²⁹. Le dystroglycan est composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β associées de façon non-covalente. Il est exprimé au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires^{229, 248}. Les attachements à la matrice extracellulaire sont médiés par la sous-unité α en interagissant avec la laminine-2. La sous-unité β permet l'attachement au cytoplasme via la dystrophine, qui lie le cytosquelette d'actine. En plus de servir de récepteur au DGPC, le dystroglycan est impliqué dans l'assemblage de la laminine et l'incorporation subséquente de perlecan et du collagène de type IV, pour former la membrane basale^{249, 250}

1.2. Structure, organisation et fonctions

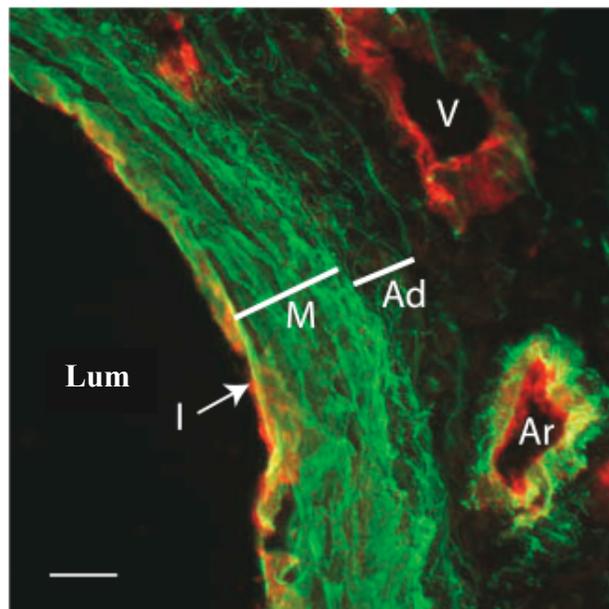
La paroi vasculaire des vaisseaux sanguins est organisée en trois couches concentriques : l'intima, la média et l'adventice (Figure 10). Ces différentes couches sont séparées par deux structures: la lamelle élastique interne et la lamelle élastique externe. Ces structures séparent la média de l'intima et de l'adventice, respectivement. L'intima consiste en une monocouche de cellules endothéliales qui reposent sur un feuillet étroit de matrice extracellulaire (la membrane basale). Le contact direct des cellules endothéliales avec le sang leur confère des rôles essentiels dans la régulation du tonus vasculaire, ainsi que dans les processus de thromolyse et de coagulation. La membrane basale, quant à elle, sert de point d'ancrage aux cellules endothéliales et agit comme frontière entre l'endothélium et la matrice extracellulaire de la média. Elle est principalement composée des collagène de type IV et XVIII, de laminines et de nidogène, ainsi que de perlecan¹⁰.

La média est constituée de cellules musculaires lisses vasculaires organisées en plusieurs couches et entourées d'une matrice extracellulaire complexe dont la composition varie selon le type de vaisseau (Figure 11). Ainsi, dans l'aorte proximale, la quantité d'élastine, organisée en lamelles élastiques, représente jusqu'à 50% du poids des vaisseaux²⁵¹. Dans les artères plus distales, comme les artérioles, les couches de cellules musculaires sont prédominantes. En plus de l'élastine, la matrice extracellulaire de la média contient également du collagène de types I et III et des protéoglycans. De par sa composition cellulaire et matricielle, la média est responsable de la contraction et de l'élasticité vasculaires.

L'adventice est la partie la plus externe de paroi vasculaire. Elle est principalement composée de fibroblastes et de collagène. Elle entoure, protège et nourrit les vaisseaux, en plus de participer à la synthèse de la matrice extracellulaire. Elle contient les *vaso vasorum*, de petits vaisseaux sanguins qui, dans les plus grosses artères, acheminent les nutriments et l'oxygène à la média, puisque la diffusion simple d'oxygène et de dioxyde de carbone y est

limitée²⁵². En fait, les *vasa vasorum* sont requis lorsque le nombre de lamelles élastiques au niveau de la média de l'artère est supérieur à 29²⁵³. Par ailleurs, des études récentes ont montré que l'adventice est un compartiment capable de détecter les lésions ou dégâts de la paroi vasculaire et contient des cellules progénitrices pouvant se différencier en CMLVs pour repeupler la média et l'intima^{254, 255}.

Figure 10 : Les trois couches de la paroi vasculaire

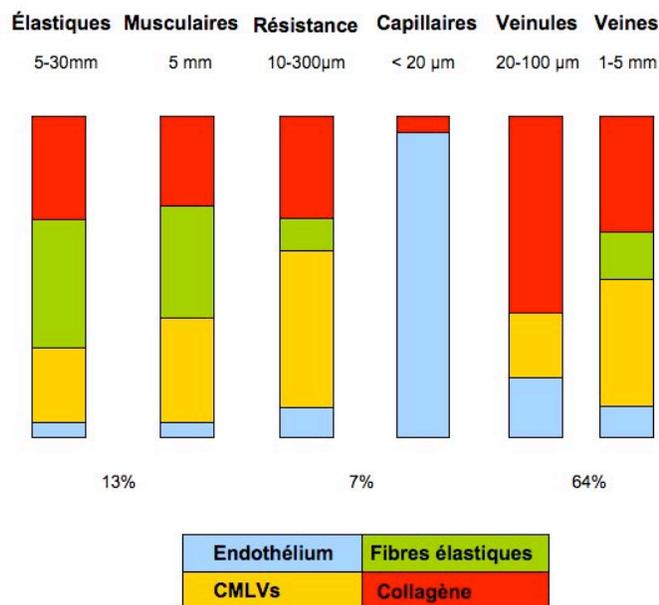


Section d'une coupe transversale d'aorte de souris vue en immunofluorescence. L'élastine est marquée en vert tandis que les cellules endothéliales sont en rouge. I représente l'intima, M la média, Ad l'adventice et Lum la lumière. On peut également repérer une veine (V) et une petite artère (Ar). Adapté de ⁷².

Le circuit fermé du système circulatoire peut être vu comme une pompe et une série de conduits qui font circuler le sang²⁵⁶. Cette pompe est alimentée par les contractions cycliques du muscle cardiaque. Il en résulte une pression et un flux sanguins pulsatiles à la sortie du ventricule gauche. Pour parer cette pulsatilité et réduire la force de traînée

(cisaillement) imposée aux cellules endothéliales, les artères de conductance ou grosses artères possèdent des propriétés élastiques. C'est le cas de l'aorte, qui dispose de plusieurs lamelles élastiques capables de s'adapter à de grandes variations de pressions et de volumes sanguins, tels que ceux présents à la sortie du cœur. Cette élasticité permet de tamponner les oscillations du flux sanguin et procure un mouvement plus homogène du sang vers la périphérie²⁵². On peut décrire les grosses artères comme étant des réservoirs élastiques. Ainsi, à chaque systole, les artères de conductance se distendent, puis, lors de la diastole, se rétractent, permettant au sang accumulé dans la portion distendue de continuer vers les vaisseaux périphériques et les capillaires. Ce phénomène porte le nom d'effet windkessel, et permet de réduire la charge au niveau du cœur en minimisant le flot systolique et maximisant le flot diastolique²⁵⁷.

Figure 11 : Composition des différents types de vaisseaux sanguins, diamètre luminal et distribution du volume sanguin (en %).



À noter que 9% du volume sanguin se trouve dans la circulation pulmonaire, et 7% au niveau du cœur.

Adapté de ^{16, 258, 259}.

Les artères musculaires sont en aval des grosses artères, et assurent l'apport sanguin à tous les tissus et organes. Ces artères sont riches en CMLVs. Elles peuvent ainsi se contracter et se dilater, ce qui permet d'ajuster le flux sanguin au niveau d'un organe. Par exemple, pendant un exercice physique, la dilatation de l'artère au niveau du muscle convoité accroît son apport sanguin et donc en oxygène. En s'éloignant du cœur, le réseau vasculaire se ramifie et donne lieu à de plus petites artères musculaires. Dans ces artères, la pression sanguine, qui ne diminue que de 2mmHg lors de son passage dans les artères de conductance, chute d'environ 20mmHg^{141, 258, 259} (Figure 12). Il est possible de comprendre ce phénomène en regardant la loi d'Ohm :

$$Q = \Delta P/R \quad (1)$$

où Q est le débit sanguin, ΔP la différence de pression entre les deux extrémités d'un vaisseau et R la résistance. Ainsi, en présence d'une grande différence de pression ΔP pour un débit constant Q, il ne peut y avoir qu'un seul phénomène compensatoire, soit une augmentation de la résistance R. Pour cette raison, les petites artères musculaires, dont le diamètre est inférieur à 300 μ m, sont appelées artères de résistance. Elles servent de robinets à la circulation sanguine. Elles augmentent ou diminuent le débit sanguin local en fonction de la demande. Les grandes artères musculaires dépendent donc de ces plus petites artères. Ainsi, lorsque les artères de résistance se dilatent, le débit sanguin local augmente. Si elles se contractent, la résistance augmente et le débit sanguin local est réduit. Il est possible de mieux comprendre ce phénomène en jetant un coup d'œil à la loi de Poiseuille :

$$Q = \pi \Delta P r^4 / 8 \eta L \quad (2)$$

où r est le rayon du vaisseau, η la viscosité du sang et L la longueur du vaisseau. Si nous intégrons cette formule à la loi de Ohm, nous obtenons :

$$\Delta P/R = \pi \Delta P r^4 / 8 \eta L \quad (3)$$

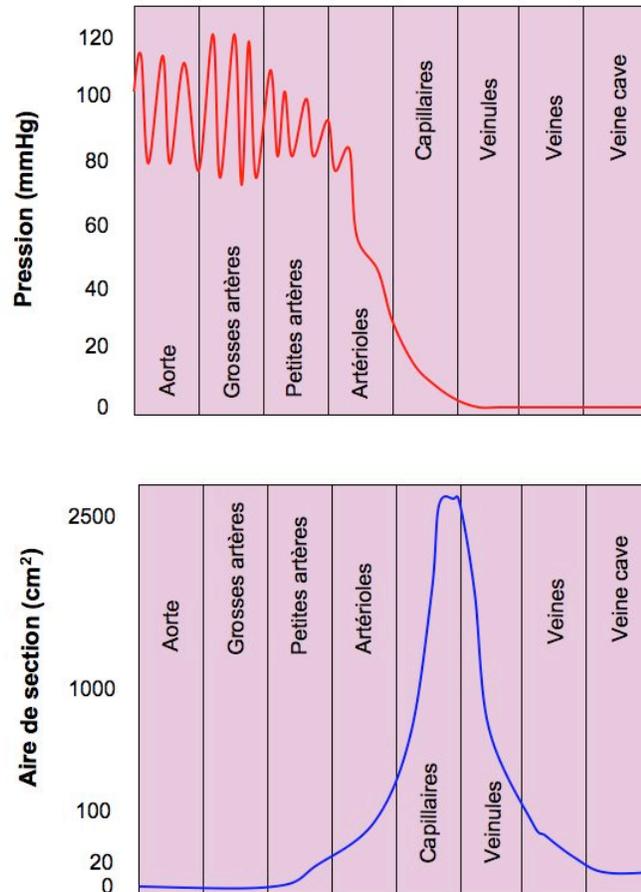
et donc

$$R = 8 \eta L / \pi r^4 \quad (4)$$

Ainsi, une modification du rayon aura une influence particulièrement importante (puissance 4) sur la résistance (R)^{141, 258, 259}.

Les artérioles, dont le diamètre varie de 10 à 100 μ m, font partie des artères de résistance. Elles ont pour fonction de réduire le débit sanguin provenant des grosses artères. Ceci réduit les dommages causés aux capillaires, qui se trouvent en aval des artérioles. Les nombreuses ramifications de l'arbre vasculaire contribuent grandement à cette fonction. En effet, si on considère l'aire de section au niveau des artérioles comme étant le nombre de vaisseaux n multiplié par l'aire de section de chaque vaisseau πr^2 , on se rend compte que l'augmentation du nombre de vaisseaux n augmente plus, dû aux ramifications, que l'aire de section individuelle des vaisseaux πr^2 ne diminue. L'aire de section totale au niveau des artérioles ($n \times \pi r^2$) est donc environ 100 fois plus grande qu'au niveau aortique (Figure 11). Si nous considérons ensuite la vitesse de la circulation du sang (cm/s) comme étant le débit sanguin volumique (cm³/s) divisé par l'aire de section, elle est réduite d'environ 200 fois entre les grosses artères et les capillaires²⁵⁹.

Figure 12 : Pressions et aires de sections des différents segments vasculaires



Adapté de ²⁵⁸.

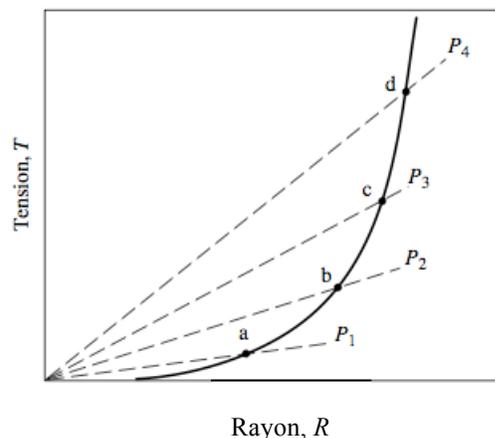
Les capillaires, qui ne possèdent pas de CMLVs, sont plutôt constitués d'une seule couche de cellules endothéliales d'une épaisseur d'environ $0,25\mu\text{m}$. Ils n'ont donc ni média, ni adventice. La surface totale des capillaires est d'environ 1000 m^2 , soit la taille d'un terrain de tennis. Ceci entraîne, tel que mentionné précédemment, la réduction du flux sanguin et permet un meilleur échange d'oxygène et de métabolites entre le sang et les tissus. En outre, les capillaires sont tellement petits, que chaque cellule d'un tissu se trouve à environ $10\text{-}20\mu\text{m}$ d'un capillaire²⁵⁹.

Le retour du sang vers le cœur débute par son passage au niveau des veinules post-capillaires. Ces dernières se fusionnent pour former les veines, dont le diamètre est plus grand. Les veinules et les veines sont plus nombreuses que les artérioles et artères correspondantes. Les veines sont également appelées « vaisseaux de capacitance ». En effet, elles contiennent environ 64% du volume sanguin. Par ailleurs, puisque la pression veineuse est faible (5-20mmHg), la paroi des veines est très mince. Or, les veines possèdent tout de même des CMLVs les rendant aptes à se contracter et se dilater pour moduler le volume sanguin en fonction des besoins^{258, 259}.

1.3. Mécanique

La structure de la paroi vasculaire s'ajuste afin de palier aux forces qui lui sont appliquées. Outre les cellules, l'élastine et le collagène sont les principaux responsables des propriétés mécaniques de la paroi vasculaire. Tel que décrit dans la section précédente, l'élastine rend les vaisseaux extensibles et est responsable de l'effet windkessel. Pour sa part, le collagène se trouve empaqueté entre les lamelles élastiques de la média et, à basse pression, ne possède aucun arrangement particulier. Cependant, les fibres de collagène s'alignent de façon circonférentielle lorsque la pression augmente. Ainsi, moins de 10% des fibres de collagène sont engagées à des pressions physiologiques. Or, lorsque la pression est accrue, les vaisseaux deviennent moins élastiques au fur et à mesure que les fibres de collagène sont recrutées. Ces dernières vont supporter la tension pariétale passive et limiter la distension^{257, 260}. Une tension supplémentaire modifie à peine le diamètre du vaisseau, puisque d'autres fibres de collagène sont recrutées. C'est ce qui explique la nature non linéaire de l'élasticité vasculaire²⁶¹ (Figure 13).

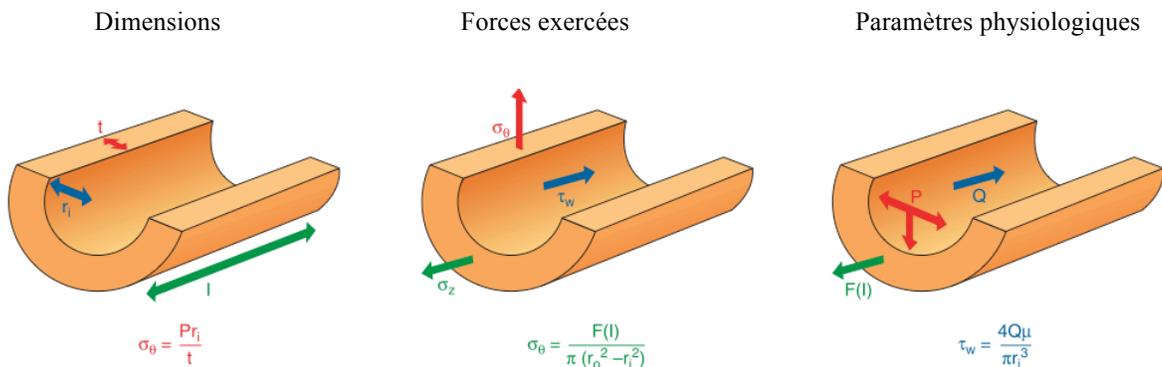
Figure 13 : Courbe de l'élasticité vasculaire en fonction de la pression



Courbe de la réponse mécanique d'une artère à une augmentation de pression, démontrant une relation non linéaire entre la tension pariétale (T) et le rayon du vaisseau (R). On peut voir que plus la pression augmente (P1-P4), plus l'augmentation du rayon s'atténue, dû au recrutement des fibres de collagène, pour une augmentation de tension donnée. Adapté de²⁵⁶.

Par ailleurs, les CMLVs doivent également reconnaître et traduire différents signaux mécaniques afin de remodeler la structure de la paroi vasculaire. Ces signaux incluent autant les ajustements face au flot sanguin et à la pression que ceux induits par les tissus environnants de même que la croissance vasculaire⁶⁸. Ce sont en fait des stress, qui peuvent être définis comme des forces appliquées à un objet sur une surface donnée. Au niveau vasculaire, 3 principales forces peuvent être observées : les forces de cisaillement provenant du flot sanguin dans la lumière du vaisseau, les forces longitudinales provenant des tissus environnants et les forces pariétales dues à la pression artérielle. Ces forces, qui découlent des trois lois de Thoma, datent de 1893, et s'appliquent au remodelage vasculaire²⁶² (Figure 14).

Figure 14 : Relations entre les dimensions, les forces exercées et les paramètres physiologiques.



Les dimensions : rayon interne (r_i), longueur (l), épaisseur (t). Les forces exercées : tension pariétale (σ_{θ}), force de cisaillement (τ_w) et force longitudinale (σ_z). Les paramètres physiologiques : le flot sanguin (Q), l'étirement ($F(l)$), la pression (P). La viscosité du sang (μ) est également représentée. Les équations montrent comment des changements aux paramètres physiologiques peuvent modifier les forces exercées sur la paroi et les dimensions des vaisseaux. Adapté de ⁶⁸.

Lorsque le flot sanguin est modulé de façon aiguë, les cellules endothéliales détectent un changement au niveau de la force de cisaillement. Elles transmettent ensuite l'information aux CMLVs qui vont se contracter ou se dilater pour modifier le diamètre vasculaire en conséquence. À plus long terme, les CMLVs vont se réorganiser, en plus de modifier les composantes de la matrice extracellulaire, afin d'accomoder la paroi vasculaire au nouveau flot sanguin et de maintenir la force de cisaillement constante²⁶³.

L'étirement longitudinal d'un vaisseau entraîne une croissance longitudinale dans la même direction afin de normaliser la force exercée. Ceci implique une prolifération accrue des CMLVs et des cellules endothéliales, de même qu'une augmentation du contenu en collagène et en élastine. Cependant, une diminution de tension longitudinale n'est pas normalisée. Ainsi, au lieu de se rétrécir, le vaisseau va s'allonger, ce qui aggrave le problème et mène à une tortuosité de l'artère^{264, 265}.

Une augmentation de la pression artérielle entraîne un étirement des CMLVs de la paroi vasculaire et accroît la tension pariétale qui leur est opposée. Ceci entraîne une augmentation de l'épaisseur de la paroi dans le but de normaliser la tension pariétale. Il semble en effet que la tension pariétale soit un paramètre contrôlé de façon intrinsèque par le vaisseau, vraisemblablement dans le but de maintenir son intégrité. Cette réponse implique une synthèse accrue de collagène, d'élastine et de protéoglycans²⁶⁶⁻²⁶⁸. Pour se faire, les CMLVs vont stimuler différentes voies de signalisation, dont Rac, PKA, PKC et p38²⁶⁹⁻²⁷¹.

Au court du développement, les CMLVs font la synthèse de plusieurs molécules de la matrice extracellulaire et peuvent adapter cette dernière afin de palier aux modulations hémodynamiques et former des vaisseaux possédant une structure optimale. Chez l'adulte, toutes ces protéines matricielles ne sont plus nécessairement synthétisées par les CMLVs. Ainsi, la modulation des forces de cisaillement, des forces longitudinales et de la tension pariétale induisent bien souvent un remodelage pathologique⁶⁸. C'est d'ailleurs ce qui se produit au cours de l'hypertension systolo-diastolique.

1.4. Remodelage artérielle dans l'hypertension systolo-diastolique

Chez un adulte, la tension artérielle est considérée optimale lorsque la pression systolique est < 120 mmHg et la pression diastolique est < 80 mmHg. Lorsqu'un individu a une pression située entre 130-139 mmHg pour la systolique et 85-89 mmHg pour la diastolique, on parle alors de pré-hypertension. La pré-hypertension n'est pas une maladie et ne requiert pas d'intervention pharmacologique. Cependant, elle sert à identifier les individus qui sont à risque de développer l'hypertension. Selon le Programme éducatif canadien sur l'hypertension de 2005, le médecin peut, à ce moment, suggérer une modification du style de vie, de façon à prévenir le développement de l'hypertension ou d'autres maladies cardiovasculaires, particulièrement si d'autres facteurs de risque sont présents (Tableau 4)²⁷². De plus, un suivi annuel est recommandé. Si un patient a une pression artérielle systolique (PAS) ≥ 140 mmHg et/ou une pression artérielle diastolique (PAD) ≥ 90 mmHg, une visite médicale consacrée à l'évaluation de l'hypertension est requise, selon les recommandations canadiennes. Lors de cette visite, si la PAS est ≥ 140 mmHg et/ou la PAD ≥ 90 mmHg, il est recommandé de prendre deux autres mesures de pression au cours de cette même visite. En plus d'un examen physique et d'une compilation des antécédents du patient, il peut être nécessaire de dépister les atteintes aux organes cibles et d'évaluer les facteurs de risque associés (Tableau 4). Une deuxième visite médicale, au cours du même mois, est également recommandée. Lors de cette deuxième visite, un diagnostic d'hypertension est posé chez les patients présentant des atteintes aux organes cibles, un diabète ou une néphropathie chronique si leur PAS est ≥ 140 mmHg et/ou la PAD ≥ 90 mmHg. Chez les patients qui n'ont pas d'atteinte des organes cibles, de diabète ou de néphropathie chronique, un diagnostic d'hypertension est posé si leur PAS ≥ 180 mmHg et/ou leur PAD ≥ 110 mmHg. Sinon, ils devraient subir de nouvelles évaluations à l'aide d'une mesure de la pression artérielle en cabinet de médecin, d'une mesure ambulatoire de la pression artérielle ou d'une mesure de pression artérielle à domicile par le patient, qui détermineront s'ils sont hypertendus²⁷³.

Tableau 4 : Facteurs de risque cardiovasculaires et dommages aux organes cibles

Facteurs de risque	Dommages aux organes cibles
Hypertension	Hypertrophie ventriculaire
Âge (> 55 chez l'homme, > 65 chez la femme)	Angine
Diabète	Insuffisance cardiaque
Niveau de LDL ou cholestérol élevé, HDL bas	Accident vasculaire cérébral
Taux de filtration glomérulaire < 60mL/min	Démence
Histoire familiale de maladie cardiovasculaire prématurée	Maladie rénale chronique
Microalbuminurie	Maladies vasculaires périphériques
Obésité (IMC > 30 kg/m ²)	Rétinopathie
Inactivité physique	
Tabac	

Adapté de ^{272,273}

Il existe deux types principaux d'hypertension : l'hypertension systolo-diastolique et l'hypertension systolique isolée. L'hypertension systolique isolée est associée au vieillissement et sera décrite dans la prochaine section. L'hypertension systolo-diastolique est caractérisée par une augmentation des pressions systolique et diastolique. Elle peut être primaire, ou essentielle, et secondaire. Elle est dite essentielle lorsqu'on ne peut y associer une cause définitive. L'hypertension est secondaire si elle apparaît suite à une condition sous-jacente, par exemples ^{272, 274} :

- Maladie rénale chronique
- Uropathie obstructive
- Syndrome de Cushing
- Phéochromocytome
- Aldostéronisme primaire
- Apnée du sommeil
- Pré-éclampsie

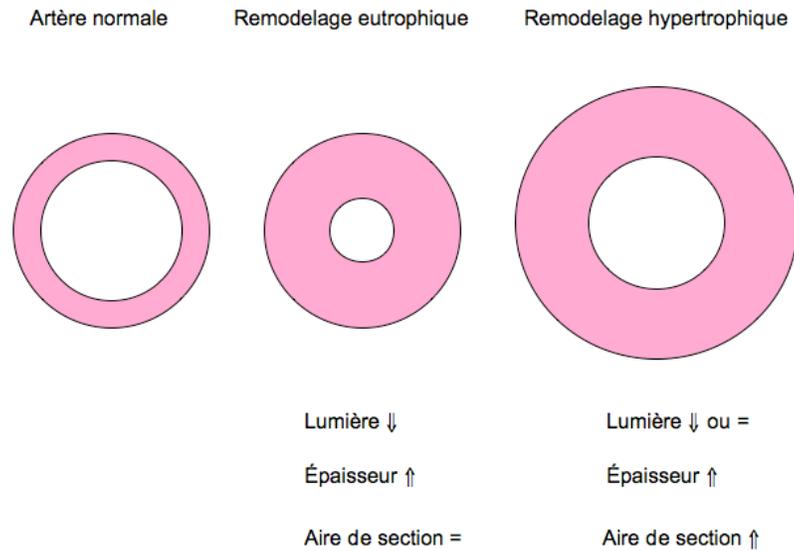
L'hypertension essentielle, qui constitue environ 90% des cas d'hypertension systolo-diastolique, est associée à un remodelage vasculaire. Au niveau des artères de résistance, l'augmentation de la pression se reflète par une diminution du diamètre et une élévation de l'épaisseur de la paroi. Le ratio média/lumière est donc accru. Cependant, ceci n'est pas associé à une augmentation de l'aire de section. Ce type de remodelage est eutrophique (Figure 15). Il est possible d'expliquer ce remodelage avec la formule des dimensions du vaisseau présentée dans la Figure 14 :

$$\sigma_{\theta} = Pr_i/t$$

où σ_{θ} est la tension pariétale, P la pression, r_i le rayon interne et t l'épaisseur du vaisseau. On peut ainsi constater qu'une augmentation de la tension pariétale, induite suite à un accroissement de la pression, peut être normalisée en réduisant le rayon interne et en augmentant l'épaisseur de la paroi. Ceci a lieu d'une part via une vasoconstriction induite par le tonus myogénique (effet de Bayliss). Il s'agit d'un processus d'auto-régulation qui permet aux petites artères de se contracter ou de se dilater en réponse à des fluctuations de pression. D'autre part, le remodelage des petites artères se produit également via une synthèse de protéines de la matrice extracellulaire par les CMLVs^{275, 276}. Ces protéines peuvent ensuite être « fixées » en place par la transglutaminase 2, dont l'activité lui permet de participer au remodelage des petites artères en agissant comme une « colle » au niveau de la matrice extracellulaire^{162, 277}.

Au niveau des artères de conductance, une augmentation de pression entraîne également une augmentation de l'épaisseur de la paroi, et donc une augmentation du ratio média/lumière. Cependant, contrairement aux artères de résistance, l'aire de section est accrue. Ce type de remodelage est appelé remodelage hypertrophique¹⁶² (Figure 15). Puisque le tonus myogénique est inexistant dans les grosses artères, ce remodelage est principalement dû à l'hypertrophie et/ou l'hyperplasie des CMLVs, ainsi que la synthèse de molécules de la matrice extracellulaire²⁷⁶.

Figure 15 : Remodelages eutrophique et hypertrophique



Le but du traitement anti-hypertenseur est de réduire la morbidité et la mortalité cardiovasculaires et rénales. Le contrôle de la pression est essentiel. Les études cliniques ont montrées qu'un traitement anti-hypertenseur est associé à une réduction de 35-40% des accidents vasculaires cérébraux, 20-25% des infarctus du myocarde, et plus de 50% des insuffisances cardiaques²⁷⁸. Le traitement anti-hypertenseur cherche à atteindre une tension artérielle < 140/90 mmHg. Pour les personnes atteintes de diabète ou de maladies rénales, cette cible est de <130/80 mmHg²⁷². La prévention de l'augmentation et le contrôle de la pression artérielle peuvent provenir de modifications au style de vie ou de traitements pharmacologiques. Les modifications du style de vie ainsi que les recommandations associées et la réduction de pression systolique atteignable sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 5 : Modifications au style de vie pour prévenir l'augmentation ou améliorer le contrôle de la tension artérielle

Modifications	Recommandations	Réductions de PAS
Réduction du poids	Maintenir un poids corporel normal (IMC 18.5-24.9 kg/m ²)	5-20 mmHg / 10 kg
Diète DASH*	Consommer une diète riche en fruits, légumes, et des produits laitiers faibles en gras	8-14 mmHg
Réduire la consommation de sel	Réduire l'apport quotidien en sel à un maximum de 100mmol par jour	2-8 mmHg
Activité physique	Faire au moins 30 minutes d'activité physique par jour	4-9 mmHg
Modération de la consommation d'alcool	Limiter la consommation d'alcool à un maximum de 2 verres par jour chez l'homme et 1 verre par jour chez la femme	2-4 mmHg

* Dietary Approches to Stop Hypertension

Adapté de ^{272, 279}.

Le traitement pharmacologique implique différentes classes de médicaments²⁷² :

- les diurétiques (Chlrotiazide, chlorthalidone, hydrochlorothiazide)
- les antagonistes des récepteurs β -adrénergiques (Atenolol, betaxolol)
- les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Benazepril)
- les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (Candesartan, Irbesartan)
- les bloqueurs des canaux calciques (Diltiazem, Amlodipine)
- les bloqueurs des récepteurs α 1 adrénergiques (Prazosin)
- les agonistes centraux des récepteurs α 2 adrénergiques (Clonidine)
- les vasodilatateurs directs (Hydralazine)

Il existe également différents programmes d'éducation mis sur pied par des organisations publiques, des professionnels de la santé, des volontaires et des agences fédérales. Ces programmes visent à conscientiser la population, de même qu'à améliorer la prévention, le traitement et le contrôle de l'hypertension. Aux Etats-Unis, où on estime qu'environ 50 millions de personnes souffrent d'hypertension, les programmes ont eu du succès depuis les années 70 (Tableau 6)²⁷². Au Canada, il existe des programmes similaires, comme par exemple le PECH (Programme éducatif canadien sur l'hypertension)²⁸⁰.

Tableau 6 : Évolution du pourcentage de la population hypertendue conscientisée, traitée et dont la tension artérielle est contrôlée entre 1976 et 2000 selon le NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*).

	1976-1980	1988-1991	1991-1994	1999-2000
Conscientisés	51	73	68	70
Traités	31	55	54	59
Tension artérielle contrôlée	10	29	27	34

Adapté de ²⁷².

2. Vieillesse vasculaire

En 1898, William Osler avait écrit que « l'homme est aussi vieux que ses artères »²⁸¹. En effet, le système vasculaire est adapté à recevoir un flot sanguin pulsatile, lui permettant de le distribuer de façon continue vers la périphérie, jusqu'aux tissus. Cependant, les pulsations répétées d'un cœur battant approximativement 30 millions de fois par année finissent par fragiliser les composantes de la paroi vasculaire. S'ensuivent différents changements, tant au niveau cellulaire qu'au niveau de la matrice extracellulaire, qui vont modifier la structure de la paroi vasculaire. Les grosses artères se dilatent et se rigidifient, affectant leurs propriétés élastiques. La perte des propriétés élastiques des gros vaisseaux soumet les petits vaisseaux à un stress accru, particulièrement au niveau des reins et du cerveau²⁸².

2.1. Changements au niveau de la matrice extracellulaire

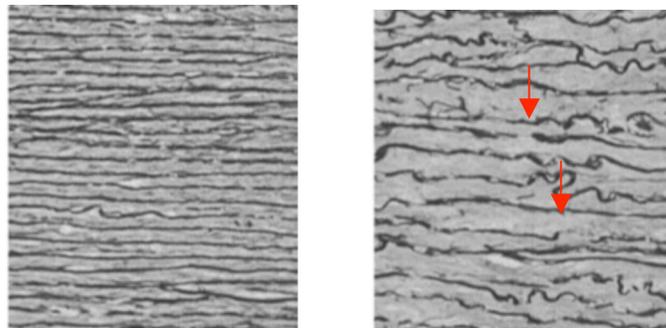
2.1.1. Fibres élastiques

Tel que décrit précédemment, les propriétés élastiques des artères de conductance dépendent principalement des fibres élastiques. L'élastine, qui représente 90% de la composition d'une fibre élastique, est une protéine insoluble qui résiste à des conditions thermiques et chimiques extrêmes. De plus, sa demi-vie est de 40 ans, ce qui en fait l'élément le plus durable de la matrice extracellulaire. Cependant, l'élastogénèse, ou la synthèse de fibres élastiques, se limite à la vie foetale et à la période néonatale⁵⁹. Ceci fait en sorte que toute altération de l'élastine ou des fibres élastiques subit après cette période est permanente. Bien sûr, certaines conditions, dont l'hypertension, peuvent augmenter la synthèse d'élastine²⁸³. Or, la formation de fibres élastiques et l'organisation en une matrice tri-dimensionnelle n'est jamais optimale une fois la période de développement terminée²⁷.

A. Fatigue mécanique du réseau élastique

Une première explication pour la perte de l'élasticité des grosses artères provient de O'Rourke qui, en 1976, a suggéré que la fragmentation de l'élastine avec l'âge était due à la fatigue du réseau élastique²⁸⁴. Dans ce même ordre d'idées, Avolio a montré, sur des coupes transversales d'aortes, l'impact que peuvent avoir les cycles cardiaques répétés sur le réseau élastique. Il a ainsi comparé l'aorte d'un tigre de 15 ans, dont la fréquence cardiaque est estimée à 64 battements par minute (bpm), à celle d'un jaguar de 15 ans, dont la fréquence cardiaque est estimée à 130bpm. À cet âge, l'aorte du tigre avait tamponné 505 millions de cycles cardiaques, alors que celle du jaguar en avait absorbé 1025 millions. En conséquences, les fibres élastiques du jaguar étaient plus désorganisées et fragmentées (Figure 16).

Figure 16 : Désorganisation et fragmentation des fibres élastiques dues à la fatigue mécanique



Sections de coupes transversales d'aortes de tigre (gauche) et de jaguar (droite). L'aorte du jaguar ayant subit environ 520 millions de cycles cardiaques de plus que le tigre, son réseau élastique est fragmenté (flèches) et désorganisé. Les deux images sont à un grossissement de 400X. Adapté de ²⁸⁵.

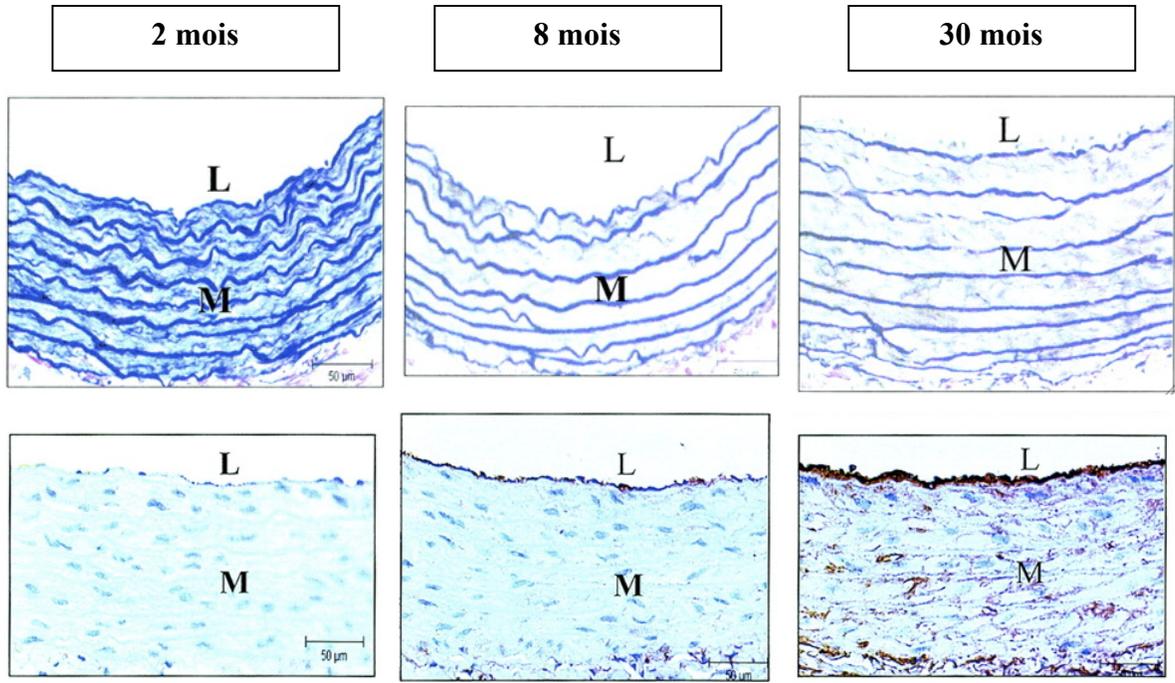
De plus, la perte des fonctions élastiques était associée à une augmentation de la tension pariétale dépendante de la pression²⁸⁵. Une autre étude a déterminé l'impact d'un étirement cyclique sur les bris d'élastine au niveau de l'aorte du cochon. Ainsi, les aortes

soumises à un étirement plus intense subissaient plus rapidement des fragmentations de l'élastine²⁸⁶. Ces observations suggèrent donc que l'étirement répété, dû à un stress cyclique, induit la fragmentation accélérée du réseau élastique. Ceci entraîne la dilatation des artères élastiques et le transfert de la charge mécanique au collagène, ce qui résulte en une augmentation de la rigidité artérielle²⁸⁷.

B. Dégradation

Une étude de Hornebeck, en 1976, a démontré une augmentation de l'activité élastase dans l'aorte chez l'humain et l'animal avec l'âge²⁸⁸. Les sérines endopeptidases, les endopeptidases aspartiques, les cystéines endopeptidases et les métallo endopeptidases sont toutes capables de dégrader l'élastine. Ce sont toutefois les métalloprotéinases matricielles qui sont le plus étudiées, et pour cause. Différentes études démontrent une association entre l'activité accrue de MMP-2 dans l'aorte et le vieillissement chez le rat. Ces observations sont associées à la dilatation de l'aorte ainsi qu'à une augmentation de l'épaisseur de la paroi. De plus, les lamelles élastiques sont amincies, fragmentées et distendues^{289, 290} (Figure 17).

Figure 17 : Fragmentation de l'élastine et augmentation de l'expression de MMP2 dans l'aorte de rats âgés de 2, 8 ou 30 mois.



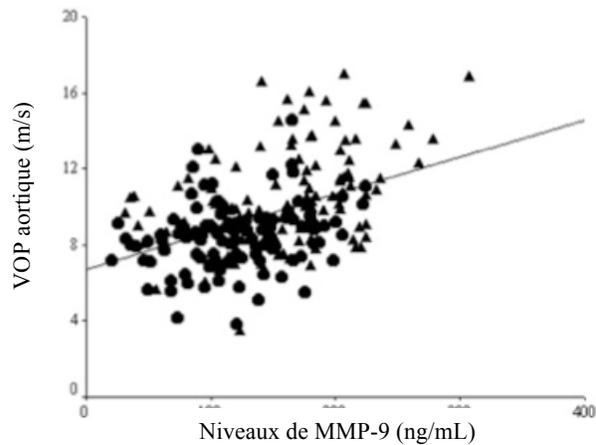
Les 3 images du haut représentent des coupes transversales d'aortes de rats âgés de 2, 8 ou 30 mois, colorées avec du Elastin van Gieson pour marquer l'élastine (bleu). On peut voir un épaissement de la paroi avec l'âge, ainsi que l'amincissement et la fragmentation des lammelles élastiques. Dans les 3 images du bas, les coupes d'aortes provenant des même rats ont été colorées avec un anticorps anti-MMP-2 (brun). On peut voir l'augmentation de l'expression de MMP-2 avec l'âge des rats. L : lumière, M : média.

Adapté de ²⁹⁰.

L'activité augmentée de MMP-2 est également observée avec l'âge dans l'aorte humaine²⁹¹. Par ailleurs, dans certaines conditions, comme les anévrismes, caractérisées par la dégradation d'élastine et la dégénérescence de la média, dont l'incidence est corrélée au vieillissement, l'activité des MMP-2, -9 et -12 est accrue^{292, 293}. De plus, la doxycycline, un inhibiteur non spécifique des MMPs, prévient l'augmentation de l'expression de MMP-2 et MMP-9 chez des souris atteintes du Syndrome de Marfan et retarde la rupture d'anévrisme associée à la pathologie²⁹⁴. L'athérosclérose est également associée à une augmentation de

MMP-9 dans le sérum chez l'homme²⁹⁵. Toutes ces conditions, puisqu'associées à une augmentation de l'activité des élastases, sont nécessairement associées à une dégradation d'élastine. Or, elles ont un autre dénominateur commun, soit l'augmentation de la rigidité artérielle. Il semble donc que la fragmentation mécanique due aux cycles cardiaques ne soit pas le seul mécanisme reliant la perte de l'élasticité à la rigidité artérielle. La dégradation enzymatique joue également un rôle. Plusieurs études font effectivement le lien entre l'activité élastase et l'augmentation de la rigidité artérielle. Ainsi, les MMP-2 et -9 et l'activité élastase dans le sérum sont corrélées à l'hypertension systolique isolée et à la rigidité artérielle²⁹⁶ (Figure 18).

Figure 18 : Corrélation entre la rigidité artérielle et la quantité de MMP-9 dans le sérum



Le coefficient de corrélation entre la rigidité artérielle (VOP, vitesse de l'onde de pouls) et les niveaux de MMP-9 dans le sérum est de 0,45 ($P < 0,001$). Cette relation suggère que 20% (r^2) des changements observés au niveau de la rigidité artérielle s'expliquent par des changements des niveaux de MMP-9 dans le sérum.

Adapté de ²⁹⁶.

De plus, certaines études montrent un lien entre le génotype de MMP-9 et une rigidité artérielle accrue. En effet, chez des patients atteints de cardiopathie coronarienne, certains possédaient un promoteur de MMP-9 présentant un polymorphisme caractérisé par la substitution d'une cytosine pour une thymidine (C-1562T). Comparativement aux homozygotes (C/C), les porteurs de l'allèle T (T/T ou C/T) exprimaient 5 fois plus de MMP-9 et une activité de MMP-9 2 fois plus élevée. De plus, leur tension artérielle systolique et leur pression pulsée étaient plus élevées, de même que la rigidité de leurs artères²⁹⁷. Un autre groupe a montré que ce même polymorphisme était associé à une rigidité artérielle accrue dans une cohorte d'individus en santé²⁹⁸. Ainsi, avec le vieillissement, il semble y avoir une augmentation de l'activité élastolytique qui est associée à une augmentation de la rigidité artérielle.

C. Calcification

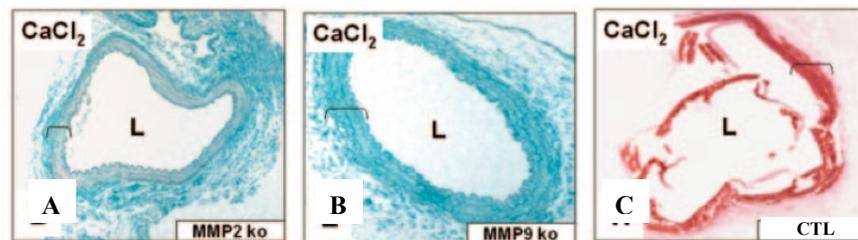
La calcification vasculaire s'apparente aux calcifications osseuse et endochondrale de différentes façons. Au niveau osseux, la minéralisation débute par la formation de vésicules par les ostéoblastes et les chondroblastes. Le micro-environnement de ces vésicules, riches en calcium, en phosphate, et exprimant l'alkaline phosphatase, est propice à la formation de cristaux d'hydroxyapatite. Cette dernière est ensuite déposée sur une matrice riche en collagène I, où elle croît de façon régulée, grâce à différentes protéines matricielles, dont l'ostéopontine, l'ostéocalcine, la *bone sialoprotein* et la MGP²⁹⁹. Au niveau vasculaire, la calcification peut également être initiée par des vésicules. C'est notamment le cas dans la calcification intimale associée à l'athérosclérose^{300, 301}, de même que dans la calcification artérielle médiale associée à la maladie rénale chronique et au diabète³⁰²⁻³⁰⁴. Ici, les vésicules sont soit des corps apoptotiques de cellules mortes ou des vésicules matricielles produites par des CMLVs et des cellules calcifiantes. La calcification peut également être initiée en association avec l'élastine et à sa dégradation, tel que décrit un peu plus loin. Par ailleurs, dans la calcification athérosclérotique (intimale) de même que dans la calcification médiale et la calcification des valves aortiques, les cellules

adoptent un phénotype ostéogénique. Les CMLVs se différencient donc en ostéoblastes, et expriment certains facteurs associés à la minéralisation osseuse, comme le Cbfa-1. La calcification des valves est également caractérisée par une néovascularisation typique de la formation osseuse^{305, 306}. Cependant, malgré son association l'expression de Sox9³⁰⁷, normalement reliée à la formation du cartilage^{308, 309}, elle demeure essentiellement non-endochondrale^{310,311}. Par ailleurs, la calcification athérosclérotique va parfois entraîner, en plus des caractéristiques déjà mentionnées, la formation complète, sur le plan architectural, d'un os trabéculaire³¹². Dans ce cas, toutes les étapes d'une calcification endochondrale sont présentes³¹³, et le tissu comprend même des éléments hématopoïétiques³¹³⁻³¹⁶.

Ainsi, en plus de la calcification des valves et de la calcification intimale associée à l'athérosclérose, il existe un autre type de calcification, celui-là au niveau de la média, et relié au vieillissement. C'est une étude de Blumenthal et al. en 1944 qui a permis d'établir un lien entre la calcification médiale et le vieillissement. Dans cette étude, il a été rapporté que seulement 4% des aortes provenant de sujets âgés de 20 à 30 ans recelaient une calcification significative, comparativement à 98% dans les aortes de sujets âgés de plus de 50 ans³¹⁷. Ce type de calcification, qui est indépendant de la calcification associée aux athéromes, augmente de 30 à 40 fois entre l'âge de 20 ans et de 90 ans. En comparaison, la calcification intimale normale, c'est-à-dire dans des zones où il n'y a pas de plaques athérosclérotiques, est relativement faible^{318, 319}. La calcification médiale est également connue sous le nom d'élastocalcinose, puisqu'elle est associée aux lamelles élastiques des artères. Par ailleurs, une étude publiée en 1950 a démontré qu'entre l'âge de 81 et 103 ans, le contenu en élastine chutait, tandis que la calcification augmentait. De plus, cette calcification était associée à une fragmentation des fibres élastiques³²⁰. Ceci suggère une implication des bris de l'élastine dans la calcification médiale. La plupart des molécules impliquées dans l'initiation et la régulation de la calcification sont de nature anionique, et facilitent l'interaction avec les composés de la matrice extracellulaire³²¹. Or, avec le vieillissement, l'élastine se fragmente. Ceci est associé à l'augmentation du nombre d'acides aminés polaires au niveau de l'élastine provenant de patients âgés. Ainsi, la fragmentation de l'élastine avec l'âge augmenterait sa polarité, et donc son affinité pour le

calcium, favorisant l'élastocalcine³²²⁻³²⁴. Le lien entre la fragmentation de l'élastine et la calcification suggère une implication des élastases dans le processus. Un rôle des MMPs dans la calcification de prothèses biologiques avait été observé dans les années 1990^{325, 326}. Cependant, ce sont Vyavahare et al., qui, les premiers, ont fait le lien entre la calcification de l'élastine et les MMPs^{327,328} au niveau vasculaire. Dans ces études, des implants d'élastine purifiée entraînaient une augmentation de l'activité des MMP-2 et -9, ainsi que de la calcification associée à l'élastine. De plus, la calcification était inhibée avec l'utilisation d'un inhibiteur des MMPs, le BB-1101, ou en pré-traitant les implants d'élastine avec du chlorure d'aluminium (AlCl₃). Ils ont également démontré que des souris déficientes en MMP-2 ou MMP-9 ne développaient pas de calcification vasculaire³²⁹ (Figure 19).

Figure 19 : Calcification chez la souris déficiente en MMP-2 ou MMP-9



Modèle de calcification induite par le CaCl₂. Les sections d'aortes sont colorées avec le rouge Alizarin (pour identifier le calcium) et contre-colorées avec le vert. On peut voir une calcification massive en C, chez une souris de type sauvage (Ctl). Les souris déficientes en MMP-2 (MMP2 ko, A) ou MMP9 (MMP9 ko, B) ne développent pas de calcification. L représente la lumière du vaisseau.

Adapté de ³²⁹.

Le mécanisme proposé implique la production de peptides de dégradation de l'élastine (matrikines) qui, en se fixant à leur récepteur, l'ELR, peuvent induire le changement phénotypique des CMLVs environnantes en un phénotype de cellules s'apparentant aux ostéoblastes. Ces cellules, en augmentant la synthèse de protéines procalcifiantes comme le Cbfa-1 et l'ostéocalcine, entraîneraient le développement de la

calcification au niveau de l'élastine^{330, 331}. Bien que les modèles utilisés par ce groupe s'éloignent de l'élastocalcinose, plus diffuse, il n'en demeure pas moins que la dégradation de l'élastine par les MMPs est impliquée dans la calcification vasculaire médiale.

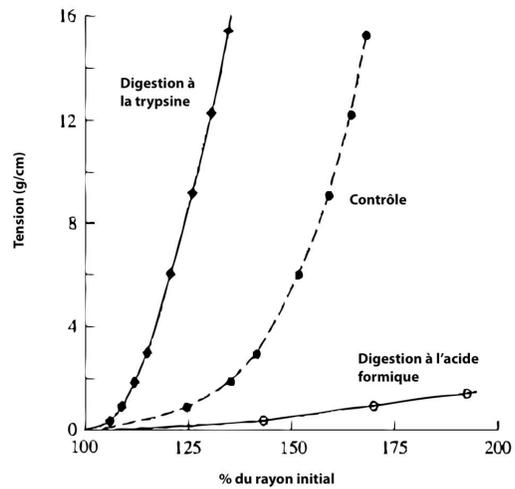
Par ailleurs, bien que nous ayons déjà établi qu'il existe un lien entre la fragmentation de l'élastine et l'augmentation de la rigidité artérielle, il semble que la calcification participe également au processus. En effet, dans son étude de 1944, Blumenthal a observé que la diminution de l'élasticité avec l'âge avait la même évolution que l'augmentation de la calcification des fibres élastiques³¹⁷. La calcification contribuerait donc à l'augmentation de la rigidité artérielle. Depuis, le lien entre la calcification et la rigidité artérielle a été confirmé dans plusieurs études, tant chez l'homme que l'animal³³²⁻³³⁵.

2.1.2. Fibrose

Les propriétés des grosses artères élastiques dépendent des quantités absolues et relatives d'élastine et de collagène. Cependant, avec l'âge, on assiste à un déséquilibre favorisant le collagène au détriment de l'élastine. En effet, certaines études ont montré que le contenu en élastine était constant avec l'âge, mais que sa concentration diminuait. Ceci se produit en raison de l'augmentation de la concentration d'autres constituants, dont le chondroïtin sulfate, l'héparan sulfate, les protéoglycans, la fibronectine et le collagène^{336,337}. Il s'agit de la fibrose. En conséquence, la paroi vasculaire s'épaissit de 2 à 3 fois entre l'âge de 20 ans et de 90 ans²⁷. Le déséquilibre est également associé à une diminution des liaisons covalentes permettant la formation et la stabilisation des fibres élastiques, tel qu'en témoigne la réduction du contenu en desmosine et isodesmosine. En revanche, ces liaisons sont plutôt accrues dans le cas du collagène³³⁸. Ceci peut être dû à la formation enzymatique de liaisons covalentes, telles que celles induites par la lysyl oxidase et la transglutaminase. Cette dernière est en effet associée à plusieurs désordres fibrotiques, dans lesquels il y a formation de liaisons covalentes de type ϵ -(γ -glutamyl)lysine au niveau

du collagène³³⁹⁻³⁴¹. Ces liens sont également présents au niveau de la fibronectine¹⁰⁵. L'augmentation de liaisons covalentes avec le vieillissement peut également se produire de façon non-enzymatique. En effet, les réactions d'oxydation entre des sucres et les groupements aminés de certaines protéines entraînent la formation de liaisons chimiquement irréversibles. Il s'agit de la réaction de Maillard. Le résultat final de cette réaction est le produit de glycation avancée, ou AGE (*advanced glycation end-product*)³⁴². Au cours du vieillissement, l'accumulation d'AGEs entraîne la formation de liaisons covalentes sur les molécules de collagène. Au niveau artérielle, cette accumulation participe à l'augmentation de la rigidité^{343, 344}. Le résultat net de la fibrose au niveau vasculaire est donc la perte de l'élasticité des grosses artères et l'augmentation de la rigidité artérielle, tel qu'en témoigne une étude effectuée par Roach et Burton en 1957²⁶¹ (Figure 20).

Figure 20 : Propriétés de l'élastine et du collagène dans la paroi artérielle



Contribution de l'élastine et du collagène à la tension de la paroi artérielle. Lorsque l'élastine est digérée par la trypsine, la courbe (losanges) représente les propriétés du collagène. Lorsque le collagène est digéré avec l'acide formique, la courbe (cercles blancs) représente les propriétés de l'élastine. La courbe pointillée représente une artère normale, non digérée.

Adapté de ²⁶¹.

2.2. Changements cellulaires

Le vieillissement n'affecte pas seulement la matrice extracellulaire. Il a également des répercussions au niveau cellulaire. De plus, la matrice extracellulaire et les cellules étant étroitement reliées, les changements observés au niveau de celles-ci influenceront nécessairement celle-là, et vice versa.

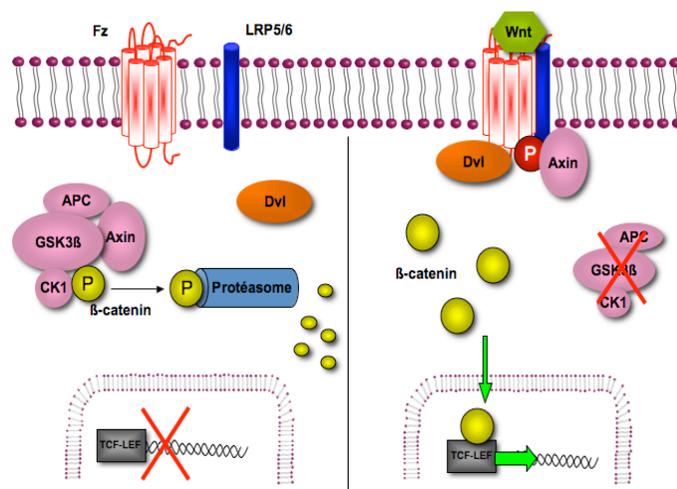
2.2.1. Cellules musculaires lisses vasculaires

Les CMLVs ont une certaine plasticité biologique, puisqu'elles peuvent exprimer différents phénotypes. Ainsi, elles passent d'un phénotype sécrétoire (synthétique) et prolifératif durant le développement à un phénotype contractile (différencié), une fois la vasculogénèse complétée. Chez l'adulte, les CMLVs prolifèrent très lentement et ont une activité sécrétoire limitée³⁴⁵. De plus, il semble que leur nombre décline^{346, 347}, bien qu'il a également été observé qu'il demeurerait le même³⁴⁸. Cependant, à la suite d'une lésion vasculaire, ou lors du vieillissement vasculaire, les CMLVs se dédifférencient en un phénotype sécrétoire³⁴⁹. Ce dernier leur permet de générer différentes molécules nécessaires à la réparation et/ou au remodelage de la paroi vasculaire. Ce retour à un phénotype sécrétoire se fait sous l'influence de différents facteurs, dont certaines cytokines et molécules de la matrice extracellulaire. Par exemple, il a été démontré dans les CMLVs provenant d'aortes de lapins, que la fibronectine et le collagène pouvaient stimuler le changement d'un phénotype contractile vers un phénotype synthétique. Par ailleurs, l'élastine et la laminine maintenaient le phénotype contractile des CMLVs³⁵⁰. D'autres protéines, telles que le collagène de type IV, peuvent renverser le changement phénotypique et restorer le phénotype contractile³⁵¹.

Le vieillissement est un autre facteur pouvant entraîner la dédifférenciation des CMLVs. En effet, il a été démontré que les CMLVs d'aortes de rats âgés prolifèrent plus rapidement que celles provenant de jeunes rats³⁵². Le phénotype synthétique entraîne également une synthèse accrue de protéines de la matrice extracellulaire, notamment le

collagène. Les CMLVs ont donc leur part à jouer dans le développement de la fibrose associée au vieillissement³⁵³. Dans les CMLVs sénescents, certaines voies de signalisation normalement activées lors du développement des vaisseaux vont être induites. C'est notamment le cas de la voie de signalisation Wnt/ β -catenin³⁵⁴. Dans cette cascade signalitique, en l'absence de la protéine Wnt sur le récepteur à 7 passages transmembranaires Frizzled (Fz), un complexe de dégradation, constitué notamment des protéines APC (*adenomatous polypolis coli*), axin et GSK-3 β (*glycogène synthase kinase*), induit l'ubiquitination et la dégradation protéosomique de la β -catenin³⁵⁵. Dans ce contexte, les niveaux de β -catenin cytoplasmiques et nucléaires demeurent bas. En présence d'un ligand Wnt, un complexe entre le récepteur Frizzled et le co-récepteur LRP5/6 est formé et inhibe le complexe de dégradation, notamment par l'inactivation de GSK-3 β . La β -catenin s'accumule ainsi dans le cytoplasme et se rend au noyau, où elle se lie aux facteurs de transcription TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) pour induire l'expression de certains gènes. Parmi les gènes induits par l'activation de la voie Wnt/ β -catenin, plusieurs, dont le collagène, sont pro-fibrotiques³⁵⁶ (Figure 21).

Figure 21 : Voie de signalisation Wnt/ β -catenin



CK1 : cyclin kinase 1, DVL : dishevelled

Les CMLVs sénescents expriment également plus de MMPs que les CMLVs plus jeunes, tant chez l'humain que chez l'animal^{357, 358}. Ceci peut contribuer à la dégradation de l'élastine et la perte des propriétés élastiques des grosses artères. La perte des fibres élastiques a également des conséquences au-delà des pertes de performance mécanique. En effet, les fibres élastiques intactes sont essentielles à l'immobilisation des CMLVs et forment une barrière physique empêchant la migration des cellules⁵⁹. L'absence de cette barrière peut donc faciliter la migration des cellules et l'épaississement de la paroi vasculaire. De plus, différentes études ont montré que les peptides dérivés de l'élastine générés par sa dégradation contribuaient à la modulation phénotypique des CMLVs contractiles en CMLVs sécrétoires³⁵⁹⁻³⁶¹. Il semble donc y avoir un cercle vicieux entre les CMLVs et la matrice extracellulaire qui mène au développement de la fibrose avec l'âge.

Ces mêmes peptides de dégradation de l'élastine sont associés à un autre changement phénotypique des CMLVs, celui-là pro-calcifiant (ou ostéogénique). En effet, Simionescu et al ont montré une augmentation de l'expression de protéines typiquement associées à la minéralisation osseuse, Cbfa-1, ostéocalcine et phosphatase alcaline, dans des cultures de CMLVs d'aortes de rats stimulées avec des peptides de dégradation de l'élastine³³⁰. Dans cette même étude, le TGF- β 1, qui peut également être libéré par la dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire, induisait également une réponse similaire aux peptides de dégradation de l'élastine. Le TGF- β 1, qui est un important médiateur de la formation osseuse, est également associé à la calcification des valves aortiques³⁶². Son expression augmente avec le vieillissement³⁶³ et il est impliqué dans la fibrose²⁷⁵.

D'autres évidences démontrent l'activation d'un phénotype ostéoblastique au niveau des CMLVs dans la calcification vasculaire. En effet, les CMLVs provenant d'artères calcifiées de patients démontrent une diminution de l'expression et de l'activation de la MGP (*matrix gla protein*), un inhibiteur physiologique de la calcification^{122, 364, 365}. Les CMLVs de ces patients expriment également davantage d'ostéonectine, de phosphatase alcaline et de *bone sialoprotein*, tous des marqueurs de l'ostéogénèse. Ainsi, il semble que

la calcification vasculaire soit un processus actif régulé par différents activateurs et inhibiteurs.

2.2.2. Cellules endothéliales

La dysfonction endothéliale apparaît graduellement avec l'âge et a lieu plus tôt chez l'homme que la femme³⁶⁶. Plusieurs études ont en effet démontré une régression de la vasodilatation dépendante de l'endothélium avec l'âge au niveau des artères coronaires, de l'artère brachiale, l'artère basilaire et des artères de résistance³⁶⁷⁻³⁷⁰. Le mécanisme précis du processus est difficile à établir chez l'humain, puisque les spécimens proviennent de patients affectés par différentes maladies. Il faut donc se rabattre sur des études animales, souvent effectuées chez le rat. Dans ce contexte, il a été démontré que l'expression de la NO synthase (eNOS) et la production de NO diminuaient avec l'âge^{371, 372}. La production d'anions superoxyde (O_2^-) contribuerait à ce phénomène en entraînant la formation de peroxy-nitrite et en induisant le découplage de la eNOS³⁷³, ce qui suggère une implication du stress oxydatif dans la dysfonction endothéliale. La concentration plasmatique de certaines hormones stéroïdes, dont le DHEA (dehydroépiandrosterone) diminue également avec l'âge³⁷⁴. Or, le DHEA stimule la production de NO dans les cellules endothéliales humaines en culture³⁷⁵. Cependant, d'autres études doivent être effectuées pour déterminer si un supplément de DHEA à long terme peut prévenir la dysfonction endothéliale associée avec l'âge.

Par ailleurs, le vieillissement est également associé à une production accrue d'endothéline par les cellules endothéliales, tant chez l'animal que l'humain³⁷⁶⁻³⁸⁰. L'endothéline, un puissant vasoconstricteur, contribuerait à la régulation à la baisse de la eNOS³⁸¹ et à la dysfonction endothéliale³⁸². De plus, le déséquilibre qui s'installe entre le NO, dont l'expression est diminuée, et l'endothéline, dont l'expression est accrue, contribue à l'augmentation du tonus vasculaire, de la rigidité artérielle et de la pression, menant au développement de l'hypertension³⁸³. Cependant, l'endothéline n'est pas

simplement un agent vasoconstricteur. Il s'agit également d'une protéine qui participe au remodelage vasculaire^{384, 385} et à la fibrose^{356, 386, 387}. De plus, certaines études ont montré un lien étroit entre l'endothéline et la calcification vasculaire³⁸⁸⁻³⁹². Les changements associés à la dysfonction endothéliale qui a lieu avec le vieillissement semblent donc converger vers une augmentation de la rigidité artérielle.

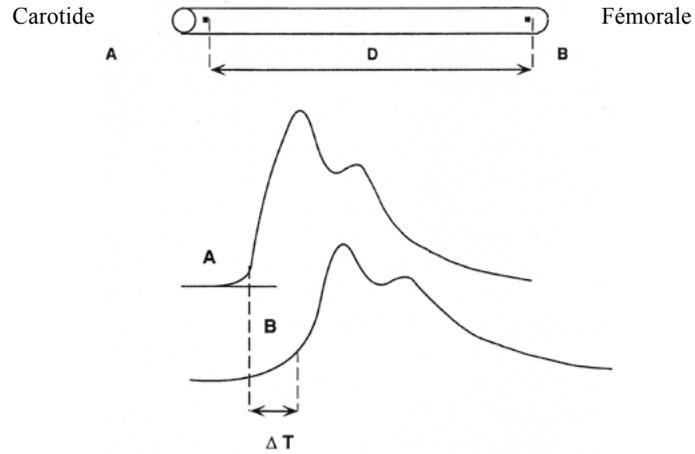
2.3. Rigidité artérielle et hypertension systolique isolée

2.3.1. Mesure de la rigidité artérielle

Le vieillissement vasculaire entraîne, tel que décrit dans les sections précédentes, des modifications au niveau de la matrice extracellulaire et des cellules de la paroi vasculaire. Le dénominateur commun de tous ces changements est l'augmentation de la rigidité artérielle. La rigidité artérielle est associée à un risque accru d'infarctus du myocarde, d'insuffisance cardiaque, d'accident vasculaire cérébral, de démence, de maladie rénale et de mortalité³⁵³. La rigidité artérielle se reflète par une augmentation de la vitesse de l'onde de pouls (VOP). La VOP se définit comme le temps requis par une onde de pression pour parcourir une distance connue le long de la paroi vasculaire. Elle est estimée en mesurant une onde de pression à deux sites différents à l'aide de capteurs sensibles à la pression³⁹³, d'ultrasons Doppler³⁹⁴, de la tonométrie³⁹⁵ ou d'ECG³⁹⁶. La distance entre les deux sites est évaluée à l'aide d'un ruban à mesurer, appliqué sur la surface du corps³⁹⁷. Par exemple, pour estimer la VOP aortique, qui représente la composante majeure de l'élasticité artérielle, on calcule le délai (t) entre le début d'une onde de pression au niveau de la carotide et le début de l'onde de pression au niveau fémoral. Si on mesure la distance (D) entre la carotide et la fémorale et qu'on la divise par le délai (t), on obtient la VOP. La figure 22 illustre la méthode de mesure de la VOP. Chez un adulte de 20 ans, la VOP est d'environ 5 m/s alors que chez un individu âgé de 80 ans, elle est d'environ 12 m/s³⁹⁸. Puisqu'elle consiste en une mesure directe et reproductible de la rigidité, qu'elle requiert peu d'expertise technique et que plusieurs études démontrent qu'elle est une valeur

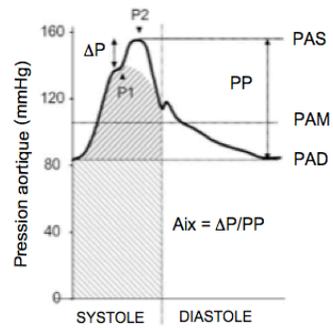
prédictive indépendante pour la mortalité cardiovasculaire³⁹⁹, la VOP aortique est considérée comme mesure étalon de la rigidité artérielle^{400, 401}. La mesure de la VOP possède néanmoins certains inconvénients, comme la difficulté d'obtenir des mesures simultanément à deux sites différents et la nécessité d'une distance relativement élevée entre ces sites pour obtenir des valeurs précises³⁹³. D'autres paramètres sont également utilisés pour mesurer la rigidité artérielle (Tableau 7). Par exemple, la compliance se définit comme le ratio entre un changement absolu du diamètre d'un vaisseau en réponse à un changement de pression. Cependant, cette mesure est justement limitée par le fait qu'elle dépend de la pression et du diamètre. En effet, plus un vaisseau est distendu, plus la compliance diminue, puisque les fibres de collagène, plus rigides, sont recrutées au détriment des fibres élastiques. Or, dans plusieurs études cliniques, la nécessité d'avoir une même pression pour comparer deux compliances est souvent omise. Ainsi, des conclusions souvent erronées décrivent une « amélioration de la compliance » qui est simplement due à une diminution de la pression⁴⁰¹. Une autre limite de cette mesure survient lorsque des vaisseaux de diamètres différents sont comparés. En effet, de plus gros vaisseaux peuvent normalement accepter un plus grand volume pour une même pression et donc possèdent une meilleure compliance⁴⁰². Un autre exemple de paramètre de mesure de la rigidité artérielle est l'index d'augmentation (Aix), la proportion de la pression pulsée résultant de l'onde de réflexion (Figure 23). Cette mesure est utile pour comprendre la post-charge au niveau cardiaque. Cependant, elle est très variable et dépend de la résistance périphérique^{401, 402}.

Figure 22 : Mesure de la vitesse de l'onde de pouls



A : Début de l'onde de pression au niveau de la carotide. B : Début de l'onde de pression au niveau de la fémorale. T : le délai entre le début des deux ondes de pression. D : distance parcourue par l'onde. Adapté de ⁴⁰³.

Figure 23 : Mesure de l'index d'augmentation



P1 : pression causée par l'onde incidente, P2 : pression résultant de la somme de P1 et de l'onde de réflexion. Adapté de ⁴⁰².

Tableau 7 : Définitions des paramètres de mesure de la rigidité artérielle

Paramètre	Définition	Formule
Vitesse de l'onde de pouls (VOP)	Vitesse à laquelle voyage une onde de pression le long d'une artère	Distance / Δt
Compliance	Changement absolu du diamètre du vaisseau en réponse à un changement de pression donné	$\Delta D/\Delta P$
Distensibilité	Changement relatif du diamètre du vaisseau en réponse à un changement de pression donné	$\Delta D/(\Delta P \times D)$
Module élastique (E)	Changement de pression requis pour étirer (théoriquement) le vaisseau à 100% de son diamètre de repos (inverse de la distensibilité)	$(\Delta P \times D)/\Delta D$
Indice de rigidité β	Ratio entre le logarithme naturel de P_s/P_d et le changement relatif de diamètre	$\text{Ln}(P_s/P_d)/[(D_s-D_d)/D_d]$
Module de Young	Module élastique par unité de surface	$(\Delta P \times D)/(\Delta D \times h)$
Pression pulsée (PP)	Différence entre la pression systolique (P_s) et la pression diastolique (P_d)	$P_s - P_d$
Index d'augmentation (Aix)	Proportion de la PP résultant de l'onde de réflexion	$(\Delta P/PP) \times 100$
Impédance (Z_c)	Augmentation de pression associée à un débit sanguin avant l'apport de l'onde de réflexion	$(Eh/R^5)^{1/2}$ ou PP/Q

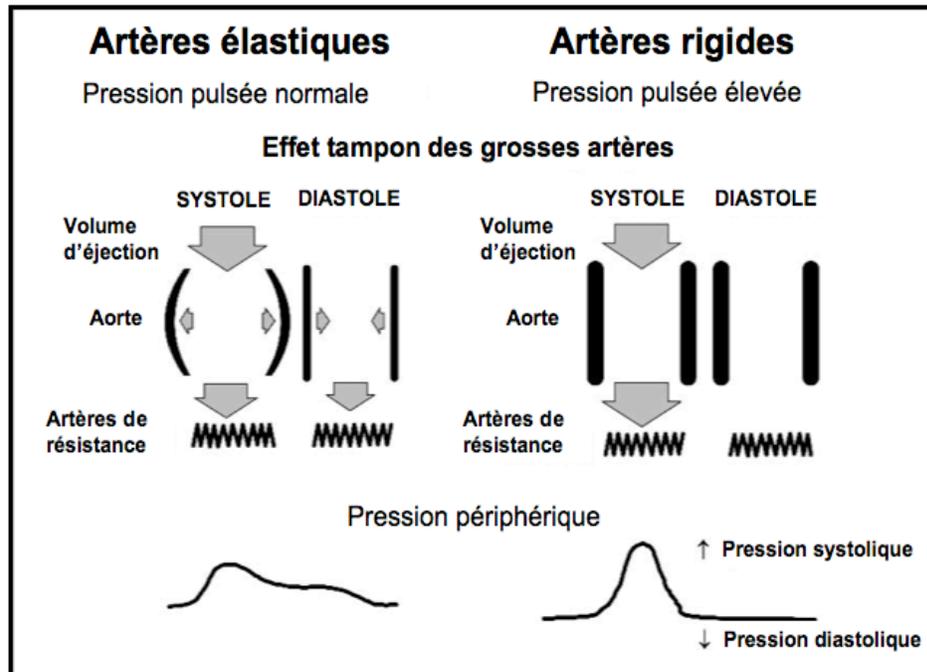
T = temps; D = diamètre; P = pression; PP = pression pulsée; h = épaisseur de la paroi; R = rayon; Q = débit.

Adapté de ^{396, 401, 404}

2.3.2. Conséquences hémodynamiques de la rigidité artérielle

Pour répondre aux besoins continus en oxygène des tissus, les artères élastiques doivent convertir les pulsations cardiaques en un flot sanguin constant vers la périphérie. Ce processus est possible grâce au tamponnage d'une portion du volume d'éjection à chaque systole, qui est ensuite libéré durant la diastole. Chez un jeune individu, dont les artères sont compliantes, le tamponnage du volume d'éjection a lieu normalement, et seule une légère augmentation de la pression systolique est observée pour un volume relativement élevé. Durant la diastole, les artères ainsi distendues se rétractent et distribuent le reste du volume d'éjection, assurant un flot sanguin régulier vers la périphérie. Ceci permet également de garder la pression pulsée relativement basse, et se reflète par une faible tension pariétale qui limite le travail imposé au ventricule gauche. De plus, chez un jeune individu, l'onde de réflexion, créée par l'arrivée du sang à la périphérie, revient vers l'aorte durant la diastole et accroît les perfusions coronaire et cérébrale. Cependant, l'augmentation de la rigidité artérielle avec l'âge va affecter ces phénomènes hémodynamiques. Ainsi, les artères rigides, et donc peu compliantes, de sujets âgés ne peuvent tamponner le volume d'éjection sans entraîner une forte augmentation de la pression systolique. Puisque l'effet tampon est perdu, le volume d'éjection complet est envoyé vers la périphérie durant la systole. La pression diastolique est donc réduite, le flot sanguin irrégulier et la pression pulsée augmente. De plus, l'onde de pression se dirigeant vers la périphérie est plus rapide, ce qui fait en sorte que l'onde de réflexion revient vers l'aorte en fin de systole plutôt que pendant la diastole, réduisant la perfusion des coronaires et des artères cérébrales. En outre, les pressions systolique et pulsée sont amplifiées, et le travail imposé au ventricule gauche est accru^{282, 401, 402} (Figure 24).

Figure 24 : Effet tampon des grosses artères et pression périphérique

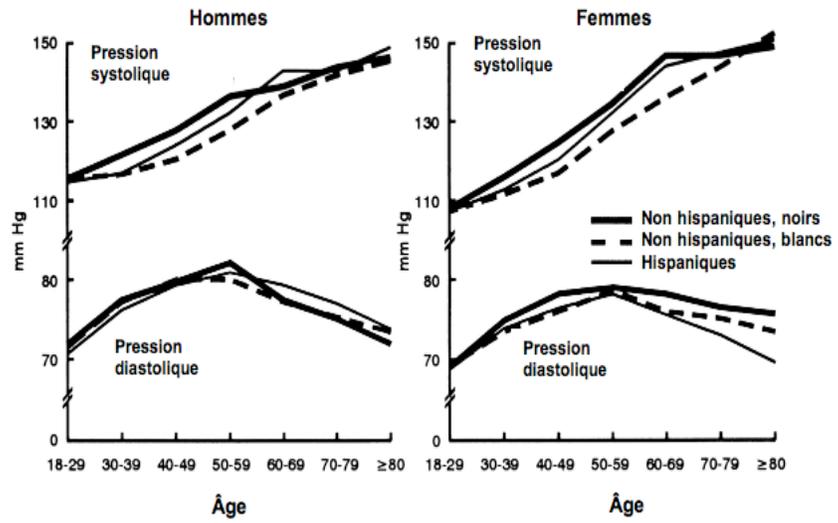


Propriétés des artères élastiques chez un sujet jeune (gauche) ou âgé (droite).

Adapté de ⁴⁰².

L'augmentation de la rigidité artérielle entraîne donc l'accroissement constant de la pression systolique avec l'âge. La pression diastolique, elle, augmente parallèlement à la pression systolique jusqu'à l'âge d'environ 55 ans, à la suite duquel elle chute (Figure 25). La pression systolique peut ainsi grimper jusqu'à une valeur supérieure ou égale à 140 mmHg. La pression diastolique, elle, peut diminuer sous les 90 mmHg. C'est le développement de l'hypertension systolique isolée (HSI). À l'âge de 60 ans, 66% des individus qui souffrent d'hypertension ont une HSI. À partir de 75 ans, cette proportion grimpe à 75%²⁷². L'HSI a plusieurs conséquences néfastes au niveau des organes cibles.

Figure 25 : Pressions systolique et diastolique de sujets âgés de 18 ans et plus



Adapté de ⁴⁰⁵.

2.3.3. Conséquences sur les organes cibles

A. Le coeur

La rigidité artérielle accroît la pression systolique, ce qui augmente la charge du ventricule gauche. À long terme, ce phénomène entraîne l'hypertrophie du ventricule gauche, accroît ses besoins en oxygène et prédispose à l'insuffisance cardiaque^{406, 407}. De plus, le cœur hypertrophié se contracte plus lentement, ce qui augmente la durée de la systole et réduit la durée de la diastole. Puisque la durée de la systole est accrue, les ondes de réflexion ont tendance à revenir vers l'aorte en fin de systole, et amplifient l'augmentation de la pression systolique. Par ailleurs, la chute de la pression diastolique diminue, tel que mentionné précédemment, la perfusion des coronaires. Or, les besoins en oxygène sont accrus. La combinaison de ces deux composantes entraîne l'ischémie cardiaque⁴⁰⁸. L'ischémie prolonge davantage la période d'éjection ventriculaire et un cercle vicieux s'installe.

B. Artères de résistance

La rigidité artérielle entraîne la perte du tamponnage du volume d'éjection et empêche les grosses artères de transformer le flot sanguin pulsatile en un flot régulier. Les pulsations doivent donc être absorbées à un autre endroit dans l'arbre vasculaire. Dans ces conditions, ce sont les artères de résistance qui se trouvent à jouer ce rôle. Ce phénomène affecte particulièrement les reins et le cerveau. En effet, les petites artères menant aux capillaires sont plus dilatées au niveau de ces tissus^{409, 410}. Elles opposent donc une moins grande résistance au flot sanguin, et les pulsations sont transmises plus facilement aux petits vaisseaux, qui sont endommagés. C'est ce qui explique pourquoi les microcirculations des reins et du cerveau sont les plus affectées chez les personnes âgées⁴¹¹. Les dommages au niveau des reins et du cerveau entraînent certaines conditions pathologiques comme l'insuffisance rénale et les accidents vasculaires cérébraux⁴¹².

2.3.4. Traitement de l'hypertension systolique isolée

A. Style de vie sain

La première étape dans la prévention et le traitement de la rigidité artérielle consiste à pratiquer un mode de vie sain. En effet, l'activité physique, le maintien d'un poids santé ainsi qu'un apport modéré en sel sont certains facteurs pouvant atténuer la rigidité artérielle. Bien que l'augmentation de la rigidité soit perçue avec l'âge même chez une personne sans maladie cardiovasculaire, elle est moins élevée chez les individus pratiquant régulièrement une activité physique aérobique (ex : course à pieds)^{413, 414}. La rigidité peut même être réduite, une fois établie, en adhérant à un programme d'exercice⁴¹⁵. En revanche, la pratique d'activités physiques en résistance (ex : musculation) augmente la rigidité artérielle⁴¹⁶. Les bienfaits de l'exercice aérobique seraient en partie attribuables à une stimulation de la production de NO⁴¹⁷.

L'obésité est associée à une rigidité artérielle élevée. En effet, l'obésité est souvent associée au syndrome métabolique, ainsi qu'à une dysfonction endothéliale et une fonction altérée des CMLVs pouvant contribuer au phénomène. Avec une perte de poids, il est ainsi possible d'améliorer la compliance artérielle et de réduire les facteurs de risque cardiovasculaire⁴¹⁸. Bien qu'il existe plusieurs diètes entraînant la perte de poids, aucune étude existante ne permet d'en favoriser une par rapport aux autres⁴¹⁹. Cependant, certains suppléments alimentaires sont associés à une VOP plus basse, dont les isoflavones^{420, 421}.

L'apport en sel dans l'alimentation a une influence importante sur la rigidité artérielle. En effet, il a été démontré dans un modèle animal, chez le rat, qu'une diète riche en sel augmentait la rigidité artérielle et modifiait la composition de la paroi vasculaire⁴²². Ces changements précédaient de plusieurs semaines l'augmentation de la pression. Le sel (NaCl) entraîne une dysfonction endothéliale, une augmentation du tonus des CMLVs, un épaissement de la paroi, une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et une synthèse accrue de collagène, de fibronectine, d'acide hyaluronique ainsi qu'un nombre accru de liaisons covalentes au niveau du collagène⁴²³⁻⁴²⁵. Chez l'humain, il

a été démontré qu'une réduction de l'apport sodé augmentait la compliance artérielle de sujets âgés^{426, 427}. De plus, l'étude TONE (*Trial of Nonpharmacologic Interventions in the Elderly*) a montré qu'en limitant l'apport en sel à 2g/jour chez des personnes âgées, sur une période de 30 mois, la pression artérielle diminuait. De plus, 40% des individus suivant cette diète ont pu arrêter leurs traitements anti-hypertenseurs⁴²⁸.

B. Traitement pharmacologique

Le diagnostic de l'hypertension systolique isolée est probablement sous-évalué dû au fait qu'il dépend essentiellement de la pression systolique brachiale. En effet, plus on s'éloigne du cœur, plus la pression pulsée est amplifiée⁴⁰². Ainsi, la pression pulsée brachiale est environ 15-20 mmHg plus élevée que la pression pulsée aortique chez un jeune adulte. Entre l'âge de 20 et de 80 ans, alors que la rigidité artérielle double, la pression pulsée brachiale passe typiquement d'environ 35 à 60 mmHg, soit une augmentation de 70%. Or, dans l'aorte, la pression pulsée passe d'environ 22 à 65 mmHg, une augmentation de plus de 200%^{398, 429}. Pour cette raison, certains chercheurs avancent que les changements artériels associés à l'âge ainsi que le concept d'hypertension sont sous-estimés^{398, 430}. Les différents paramètres de mesure de la rigidité artérielle décrits dans le Tableau 6 pourraient peut-être améliorer le diagnostic et diminuer le pourcentage d'hypertendus non traités, qui se situe entre 11-20%⁴³¹.

Le contrôle de la pression chez des sujets hypertendus âgés est d'environ 20%, principalement dû à un mauvais contrôle de la pression systolique⁴³². Ainsi, en 2000, la pression systolique est devenue la cible principale des traitements anti-hypertenseurs⁴³³. Malheureusement, ces traitements ont évolué en thérapies visant principalement à réduire l'hypertension systolo-diastolique, mais ne sont pas nécessairement appropriés pour l'HSI⁴³⁴. La plupart des traitements pharmacologiques entraînent la relaxation des CMLVs et la vasodilatation artérielle, ce qui permet de réduire la résistance périphérique. Ainsi, le tonus des CMLVs diminue, ce qui tend à réduire indirectement l'amplitude de l'onde de

réflexion, de même que les pressions systoliques et pulsées, et la VOP^{398, 435-439}. Il n'y a cependant pas d'effet direct sur la rigidité artérielle.

Pour le traitement de l'HSI, le programme éducatif canadien 2010 recommande l'utilisation de diurétiques thiazidiques, de bloqueurs des canaux calciques dihydropyridine (BCC), d'antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA), d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) ou de beta-bloquants. Le traitement, ou la combinaison de traitements, dépendra de la sévérité de la pathologie et des co-morbidités associées²⁷⁹. Ces médicaments ont en effet montré des effets bénéfiques dans le traitement de l'HSI. L'étude SHEP (*Systolic Hypertension in the Elderly Program*) a démontré les effets d'un diurétique, la chlorthalidone, chez des hypertendus âgés de plus de 60 ans avec une pression systolique > 160 mmHg et une pression diastolique < 90mmHg. Ce traitement, donné avec ou sans beta-bloquant, a permis la réduction des incidences d'accidents vasculaires cérébraux de 36%, d'insuffisance cardiaque de 54%, d'infarctus du myocarde de 27% et des événements cardiovasculaires totaux de 32% par rapport à un groupe placebo⁴⁴⁰. Une autre étude, Syst-EUR, a étudié les effets de la nitrendipine, un BCC. Ce traitement, comparativement au placebo, a permis une réduction des AVC de 41% et des événements cardiovasculaires totaux de 31%⁴⁴¹. Les ARA ont également démontré leur efficacité dans la réduction de la pression artérielle et de l'hypertrophie cardiaque associée à l'HSI^{442, 443}. Ces médicaments montrent donc une utilité évidente pour traiter l'HSI. Cependant, il n'en demeure pas moins que la vasodilatation ne règle pas le problème, c'est-à-dire l'ensemble des modifications structurales que subit la matrice extracellulaire et les changements au niveau de la signalisation cellulaire menant au développement de la rigidité artérielle. Or, il est intéressant de constater que les traitements recommandés pour l'hypertension systolique isolée ont également des effets au-delà de la vasodilatation. De plus, certaines nouvelles thérapies ciblent directement les changements au niveau de la paroi vasculaire.

Par exemple, l'inhibition du SRAA par des ARA, des IECA ou des antagonistes du récepteur de l'aldostérone (spironolactone, diurétique) prévient la fibrose au niveau du

cœur et des vaisseaux dans des modèles animaux⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁷. Les ARA et IECA peuvent même renverser la fibrose vasculaire et cardiaque⁴⁴⁸⁻⁴⁵¹. Par ailleurs, il a été démontré qu'un antagoniste du récepteur de l'endothéline (ETRA, Bosentan) pouvait également entraîner la régression de la fibrose vasculaire⁴⁵². Un autre ETRA, le darusentan, a prouvé son efficacité dans la prévention et la régression de l'augmentation de la calcification, du ratio collagène/élastine et de la pression pulsée dans un modèle d'HSI chez le rat. Dans cette même étude, l'irbesartan, un ARA, et l'hydrochlorotiazide, un diurétique, ont pu prévenir le développement d'HSI. Cependant, ils n'ont pu entraîner la régression de la calcification, alors que seul l'ARA est parvenu à régresser l'augmentation de la pression pulsée³⁸⁸. Dans le même modèle, une autre étude a montré la prévention de l'HSI par un BCC, l'amlodipine, en empêchant la calcification vasculaire et l'augmentation de la rigidité artérielle. L'amlodipine a également entraîné la régression de la calcification, mais non de la rigidité artérielle, puisqu'elle n'avait pas d'impact sur la fibrose³⁹¹.

Au niveau de la paroi vasculaire, le NO module le tonus vasculaire et fait contrepoids à l'endothéline. Certaines études ont ainsi illustré que l'utilisation de mononitrate d'isosorbide, une prodrogue menant à la formation de NO, permettait de réduire l'onde de réflexion, la pression systolique et la pression pulsée⁴⁵³⁻⁴⁵⁵. Une autre alternative consiste à augmenter les effets endogènes du NO en bloquant le catabolisme du GMPc via l'inhibition de la phosphodiesterase 5. Dans ce contexte, l'utilisation du sildenafil a entraîné une diminution de l'onde de réflexion et de la pression pulsée⁴⁵⁶. Il a également été démontré que le T-1032 prévenait la calcification vasculaire dans un modèle *ex vivo*. Cependant, le tadalafil, un autre inhibiteur de la phosphodiesterase 5, n'a pas entraîné l'inhibition de la calcification *in vivo*⁴⁵⁷. Les statines, inhibiteurs de la HMG-CoA (*3-hydroxy-3-méthyl-glucurayl-CoA reductase*) peuvent également améliorer la rigidité artérielle, en partie via l'activation de la eNOS^{419, 458}. En effet, certaines statines peuvent induire la phosphorylation de eNOS en activant Akt dans les cellules endothéliales^{459, 460}.

Par ailleurs, il semblerait qu'un lien existe entre la résorption osseuse et la calcification vasculaire⁴⁶¹. Le « *calcification paradox* » provient d'ailleurs du fait que la

calcification vasculaire est souvent plus élevée chez les sujets souffrant d'ostéoporose par rapport aux sujets sains^{462, 463}. En outre, une réduction de la densité osseuse est associée à une augmentation de la VOP⁴⁶⁴. Par ailleurs, il a été suggéré que les bisphosphonates, qui réduisent la résorption osseuse, pouvaient prévenir le développement de l'élastocalcinose chez le rat⁴⁶⁵. Les bisphosphonates sont des analogues du pyrophosphate inorganique (PPi) résistants à la dégradation enzymatique⁴⁶⁶. Le PPi, dont la production dépend du transporteur membranaire ank^{299, 467} et de l'*ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I* (NPP1)⁴⁶⁸, inhibe la formation des cristaux d'hydroxyapatite et la minéralisation tissulaire^{299, 311, 468}. Il est également le substrat de l'alcaline phosphatase, qui l'hydrolyse afin d'induire le dépôt de calcium³⁰⁴. Employés à faibles doses, les bisphosphonates sont utilisés pour traiter des maladies osseuses caractérisées par une résorption osseuse accrue, telles que l'ostéoporose, la maladie de Paget, les lésions ostéolytiques et l'hypercalcémie associée au myélome multiple⁴⁶⁶. Les bisphosphonates agissent en inhibant la différenciation des ostéoclastes, en induisant l'apoptose des ostéoclastes et en réduisant l'activité ostéoclastique par inhibition de la prénylation protéique⁴⁶⁹. Utilisés à doses plus élevées, les bisphosphonates peuvent également inhiber la calcification vasculaire en empêchant la formation et l'agrégation de phosphate de calcium et la formation de cristaux d'hydroxyapatite⁴⁶⁹.

Certaines nouvelles avenues thérapeutiques ciblent directement les liaisons covalentes qui se forment au niveau des protéines de la matrice extracellulaire. C'est le cas de l'ALT-711, une molécule qui brise les AGEs. Bien que l'ALT-711 ait entraîné une diminution de la rigidité artérielle de 25% chez le singe⁴⁷⁰, les résultats chez l'humain ont montré des effets moins importants. En effet, une étude a démontré une augmentation de la compliance de 15% et une diminution de la VOP de 8%⁴⁷¹. Dans une seconde étude, aucun effet n'a été observé sur la distensibilité aortique⁴⁷².

2.3.5. Modèles animaux

Les modèles animaux ont pour but de reproduire chez l'animal, sur une période relativement courte, l'ensemble des changements observés chez l'homme, souvent sur une longue période (personne âgée), menant à une condition pathologique. Les modèles animaux sont utilisés en recherche pré-clinique pour effectuer des expériences de preuve de concept et pour déterminer l'efficacité d'un nouveau candidat de traitement, en regard à certains biomarqueurs de la fonction cardiovasculaire^{473, 474}. Dans le contexte de la rigidité artérielle, les premières expériences animales datent de 1881⁴⁷⁵. Aujourd'hui, les modèles animaux sont diversifiés, passant par l'occurrence naturelle de la pathologie avec le vieillissement, à l'induction par une intervention chirurgicale, un traitement chimique ou une modification génétique. La rigidité artérielle peut ainsi être reproduite par l'induction d'une ischémie⁴⁷⁶ ou en remplaçant l'aorte par un tube rigide⁴⁷⁷. Cependant, le rapprochement avec la pathologie de l'hypertension systolique isolée n'est pas toujours évident. Les modèles les plus utilisés sont ceux qui reproduisent l'augmentation de calcification vasculaire médiale au niveau de la matrice extracellulaire dans le vieillissement. Les avantages et inconvénients de ces modèles sont décrits au Tableau 8.

A. Modèle de vieillissement

Il est probable que le rat et les autres animaux utilisés en laboratoire ne vivent pas assez longtemps pour développer les mêmes altérations cardiovasculaires que celles observées chez l'homme, particulièrement chez un sujet âgé. Cependant, bien que les durées de vie soient différentes, il n'y a pas de raison de croire que les séquences d'événements pathophysiologiques soient différentes chez l'homme que chez les autres animaux⁴⁷³. Ainsi, le modèle animal qui, potentiellement, peut reproduire le plus fidèlement l'augmentation de la calcification et de la rigidité artérielle observées chez l'homme est celui du vieillissement chez l'animal. À ce sujet, une étude de Kieffer et al. en 2000 a démontré l'augmentation de la calcification artérielle dans 3 souches de rats : Wistar,

Fischer 344 et Wistar Kyoto, entre l'âge de 3 et 30 mois. Les auteurs ont également observé une augmentation de la pression systolique chez le rat Wistar Kyoto de 130 mmHg à 159 mmHg entre l'âge de 3 et de 15 mois. Toutefois, cette augmentation n'est pas discutée puisque les auteurs ne comparent pas les groupes Wistar Kyoto 3 mois vs 15 mois. En effet, les auteurs spécifient plutôt ne pas avoir observé de changement de pression. Pourtant, l'augmentation de 29 mmHg entre les Wistar Kyoto de 3 mois et les Wistar Kyoto de 15 mois est probablement significative, vu le n (12 et 13) et l'erreur type de la moyenne (2 et 4 mmHg) de ces groupes⁴⁷⁸. Michel et al. ont également étudié l'effet du vieillissement sur la fonction et la structure des vaisseaux chez le rat. Bien qu'aucune augmentation significative de la pression artérielle systolique ait été notée, une augmentation de la pression pulsée et de la rigidité artérielle ont été observées⁴⁷⁹. Par ailleurs, même si le rat âgé a une augmentation de calcification et de rigidité artérielles, aucune étude ne fait l'association entre le modèle de vieillissement chez le rat et le développement de l'hypertension systolique isolée. Il serait intéressant d'étudier l'effet du vieillissement chez le rat au-delà de 30 mois. Cependant, le taux de mortalité des rats augmente rapidement au-delà de l'âge médian, c'est-à-dire environ 27 mois⁴⁷³. Si on ajoute à cela le coût élevé pour l'hébergement des rats sur une telle période et le manque de flexibilité d'une étude de régression, la plupart des études semblent réfractaires à ce modèle.

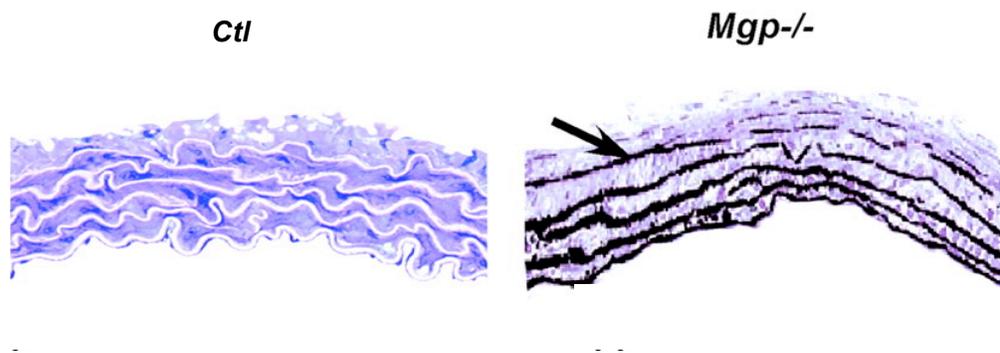
B. Modèles génétiques

a. Souris déficientes en MGP

La MGP (*matrix gla protein*) lie le calcium sous forme ionique ou cristallisée (hydroxyapatite) et l'empêcherait de se fixer dans la matrice de la paroi vasculaire. Le mécanisme exact par lequel elle agit n'est toutefois pas connu⁴⁸⁰. Le rôle essentiel de la MGP dans la prévention de la calcification vasculaire a été révélé par une étude de Luo et al. publiée en 1997. Cette étude a démontré que des souris MGP^{-/-} se développent à terme et

n'ont pas de phénotype particulier dans les premières semaines de vie. Cependant, elles meurent dans les deux premiers mois de vie. En effet, une calcification vasculaire massive se développe et entraîne la rupture de l'aorte, causant la mort par hémorragie³⁶⁵ (Figure 26).

Figure 26 : Calcification aortique chez la souris $MGP^{-/-}$



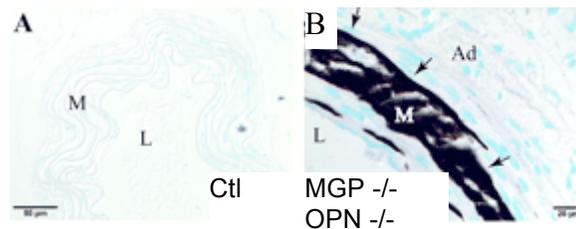
Coloration Von Kossa de coupes transversales d'aortes chez la souris de type sauvage (Ctl) et déficiente en MGP ($Mgp^{-/-}$). La flèche point une zone de calcification sur une des lamelles élastiques.

Adapté de ⁴⁸¹.

b. Souris déficientes en MGP et OPN

L'ostéopontine (OPN) est normalement exprimée au niveau osseux, où elle régule la minéralisation en stimulant les ostéoclastes via l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ⁴⁸². Elle est également présente au niveau de la paroi artérielle, au cours de la calcification artérielle médiale³⁹⁰, où elle prévient la croissance des cristaux d'hydroxyapatite⁴⁸³. Or, les souris déficientes en OPN ne développent pas de calcification vasculaire, puisque l'OPN n'est pas exprimée dans les parois vasculaires en conditions physiologiques normales⁴⁸⁴. Par contre, les souris déficientes en MGP et OPN calcifient 2 fois plus que les souris MGP^{-/-} après 2 semaines, et 4 fois plus au bout d'un mois. La mortalité survient en moyenne deux semaines plus tôt dans les souris MGP^{-/-}-OPN^{-/-} que dans les souris MGP^{-/-} (Figure 27).

Figure 27 : Calcification aortique dans le modèle MGP^{-/-}-OPN^{-/-} chez la souris



Coloration Von Kossa sur des sections transversales d'aortes de souris de type sauvage (Ctl, A) et déficientes en MGP et OPN (MGP^{-/-}-OPN^{-/-}, B). Les flèches montrent les zones calcifiées dans la média (M). Ad représente l'adventice et L la lumière.

Adapté de ⁴⁸⁴.

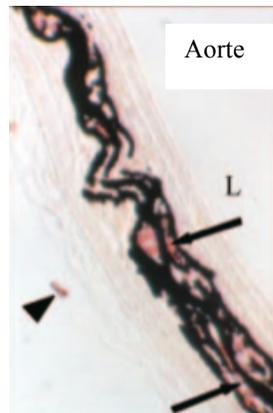
C. Modèles d'induction chimique

a. Modèle vitamine D et nicotine

Le modèle de rats VDN utilisé aujourd'hui constitue une adaptation d'un modèle préalablement établi par Fleckenstein en 1985, qui comportait un taux de mortalité trop élevé⁴⁸⁵. L'injection intramusculaire de vitamine D₃ (300 000IU/kg) ainsi que deux doses

orales de nicotine (25mg/kg) entraînent une calcification massive au niveau des fibres élastiques de la média aortique^{486, 487}. Le cœur, les reins et d'autres organes montrent également une calcification, bien qu'elle soit moins importante. La vitamine D3 entraîne une hypercalcémie temporaire tandis que la nicotine potentialise l'accumulation de calcium via la libération accrue de Ca^{2+} intracellulaire⁴⁸⁸ et la stimulation de la fragmentation d'élastine⁴⁸⁷. Le modèle est également associé à l'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et du co-transporteur de phosphate Pit-1⁴⁸⁹. Ce modèle s'accompagne d'une augmentation de la rigidité artérielle et entraîne le développement de l'hypertension systolique isolée³³⁵ (Figure 28).

Figure 28 : Calcification aortique dans le modèle VDN



Coloration Von Kossa d'une coupe transversale d'aorte d'un rat VDN. La flèche pointe une zone de calcification sur une lamelle élastique de la média. L représente la lumière du vaisseau. Les zones rose foncé/rouges représentent les macrophages (triangle noir).

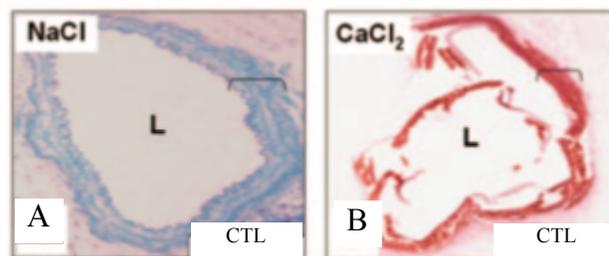
Adapté de ⁴⁸⁶.

b. Modèle de chlorure de calcium

L'application péri-artérielle de faibles concentrations (0,1mM à 0,2mM) de chlorure de calcium (CaCl_2) au niveau de l'aorte abdominale constitue un modèle de lésion

vasculaire chez le rat et la souris. Il est associé à une importante calcification et dégradation de l'élastine³²⁹. L'application préalable de chlorure d'aluminium (0,0025mM) prévient le développement de la calcification, de même que l'induction d'une déficience en MMP-2 ou MMP-9. Le TGF- β 1, un facteur déterminant dans la réponse à une lésion⁴⁹⁰, serait impliqué dans ce modèle de calcification. (Figure 29)

Figure 29 : Calcification aortique dans le modèle de calcification au CaCl₂ chez la souris



Coloration au rouge Alizarin de coupes transversales d'aortes de souris de type sauvage (Ctl) traitées avec du NaCl (souris témoins, A) ou du CaCl₂ (B). Les zones calcifiées sont colorées en rouge. L représente la lumière.

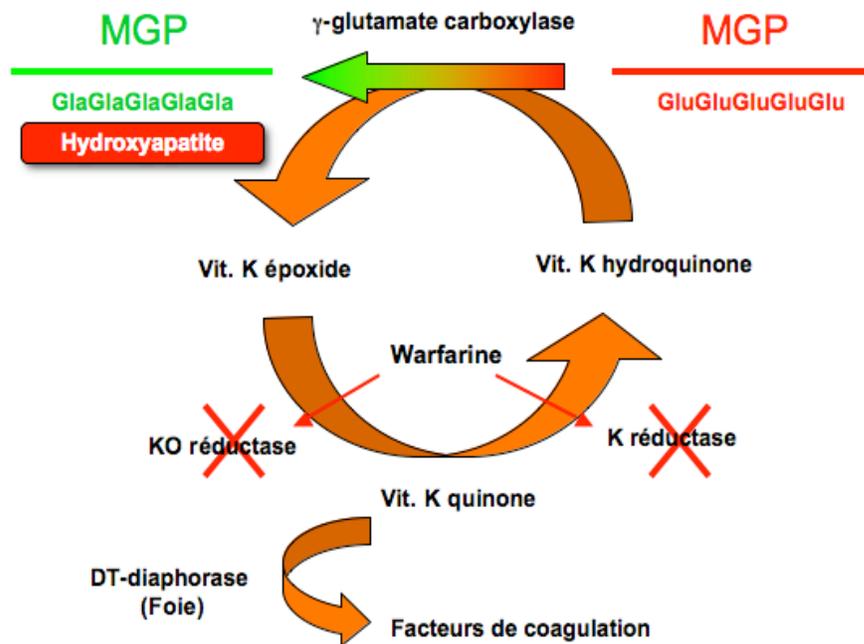
Adapté de ³²⁹.

c. Modèle warfarine-vitamine K (WVK)

L'activité anti-calcifiante de la MGP dépend de la modification de ces cinq acides glutamiques (Glu) en acides carboxyglutamiques (Gla) par une enzyme dépendante de la vitamine K1 (hydroquinone), la γ -glutamate carboxylase⁴⁹¹. Ce sont les résidus Gla qui, en liant l'hydroxyapatite, préviendraient son dépôt au niveau de la paroi artérielle⁴⁹². L'utilisation de warfarine empêche le recyclage de la vitamine K en sa forme active (K1) en bloquant deux enzymes : la vitamine K époxide réductase (VKOR) et la vitamine K réductase (VKR). La MGP se trouve toujours dans la paroi, au niveau de la calcification, mais sous sa forme inactive. Or, puisque la vitamine K1 participe à la formation de facteurs

de coagulation, la warfarine entraîne également des hémorragies chez les rats. L'administration de vitamine K quinone (phytonadione) prévient l'hémorragie. En effet, la vitamine K quinone est utilisée par une enzyme du foie, la DT-diaphorase, qui permet sa réduction en vitamine K1⁴⁹³. De plus, cette enzyme étant 100 fois moins active dans l'aorte que dans le foie, la vitamine K1 aortique n'est pas formée en quantité suffisante pour inhiber la calcification (Figure 30).

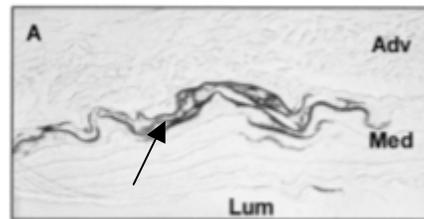
Figure 30 : Fonctionnement du modèle warfarine-vitamine K



Ce modèle a été adapté dans notre laboratoire à partir du modèle établi par Price et al.⁴⁹⁴. Ce dernier impliquait trois injections par jour, soit deux injections de warfarine et une

injection de vitamine K. Nous administrons plutôt la warfarine dans l'eau de boisson, alors que la vitamine K est injectée tous les deux jours. Dans notre laboratoire, le modèle WVK entraîne l'augmentation de la calcification, au niveau des lamelles élastiques de la média (Figure 31), durant la deuxième semaine de traitement³³³. Un plateau de calcification est atteint autour de la 4^e semaine, qui est maintenu jusqu'à la 8^e semaine de traitements³⁹¹. Cette calcification s'accompagne d'une augmentation des pressions systolique et pulsée, de la rigidité artérielle, et mène au développement de l'HSI. Ce modèle s'apparente à la calcification vasculaire chez des patients âgés, où l'expression et l'activité de la MGP sont diminuées^{122, 364, 365}.

Figure 31 : Calcification aortique dans le modèle WVK chez le rat



Coloration Von Kossa d'une coupe transversale d'aorte de rat WVK. La calcification se situe principalement au niveau des lamelles élastiques près de l'adventice (Adv). Med représente la média et Lum la lumière du vaisseau. La flèche point une zone de calcification.

Adapté de ³⁸⁹.

Tableau 8 : Avantages et inconvénients des différents modèles animaux de calcification vasculaire médiale.

Modèles	Avantages	Inconvénients
Vieillessement (rats)	<ul style="list-style-type: none"> • Physiologique 	<ul style="list-style-type: none"> • Coûteux • Peu flexible • Lien avec pathologie humaine incertain
Souris MGP ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> • Mécanisme spécifique • Mécanisme endogène 	<ul style="list-style-type: none"> • Calcification exagérée
Souris MGP ^{-/-} OPN ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> • Mécanisme spécifique • Mécanisme endogène 	<ul style="list-style-type: none"> • Calcification exagérée
Rats VDN	<ul style="list-style-type: none"> • Flexible 	<ul style="list-style-type: none"> • Calcification exagérée • Mécanisme non spécifique • Lien avec pathologie humaine incertain
Rats CaCl ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Rapide 	<ul style="list-style-type: none"> • Non physiologique • Lien avec pathologie humaine incertain
Rats WVK	<ul style="list-style-type: none"> • Lien avec pathologie humaine • Flexible • Mécanisme endogène 	<ul style="list-style-type: none"> • Coûteux (vitamine K) • Demande beaucoup de temps • Warfarine métabolisée par CYP2C9, implique de nombreuses interactions

2.3.6. Modèles in vitro et ex vivo

Les conditions menant à la formation de cristaux d'hydroxyapatite, soit une concentration élevée de calcium et de phosphate dans les artères chez l'homme et l'animal, peuvent également être reproduites en milieu de culture⁴⁹⁵. En effet, en élevant les niveaux de phosphate dans le milieu de culture des CMLVs, il est possible d'entraîner la formation de cristaux d'hydroxyapatite et d'induire la calcification de la matrice extracellulaire entourant les cellules⁴⁹⁶⁻⁴⁹⁹.

Ex vivo, des anneaux aortiques peuvent également être mis en culture en présence de 3,8 mM de phosphate (NaH_2PO_4), 10 mM de β -glycérophosphate ou 7,5 unités/mL de phosphatase alcaline. Après 9 jours, la coloration Von kossa révèle une calcification vasculaire médiale, identifiée comme étant un dépôt de cristaux d'hydroxyapatite par rayons X^{500, 501}.

Objectifs

Le vieillissement vasculaire est associé à plusieurs changements au niveau de la matrice extracellulaire. En effet, on assiste à l'activation d'enzymes, l'accumulation et la dégradation de protéines matricielles et l'activation de facteurs fibrotiques et pro-calcifiants. Ces modifications ont un impact au niveau des cellules de la paroi vasculaire, qui, elles aussi, peuvent orchestrer une multitude de changements au sein de leur environnement, soit la matrice extracellulaire. En conséquences, la composition, la structure et l'organisation de la paroi sont chambardées et entraînent une augmentation de la rigidité artérielle. Cette dernière influence à son tour les paramètres hémodynamiques et mène au développement de l'hypertension systolique isolée.

Dans tout le processus de modifications de la matrice extracellulaire, certains facteurs sont bien identifiés, alors que d'autres demeurent inconnus. Durant mon doctorat, j'ai voulu:

- a. Établir la séquence des événements qui ont lieu au niveau de la matrice extracellulaire lors du développement de l'hypertension systolique isolée.
- b. Évaluer l'importance de la transglutaminase 2 dans le processus

Résultats

3. Sequential Activation of Matrix Metalloproteinase 9 and Transforming Growth Factor β in Arterial Elastocalcinosis

Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2008; 28 :856-862

Céline Bouvet, Pharm D.^{1*}, Simon Moreau^{1*}, Joannie Blanchette¹, Denis deBlois²,
PhD. and Pierre Moreau, PhD¹.

¹Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

²Department of pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Quebec, Canada

*These authors contributed equally to the project

Les deux premiers auteurs ont contribué de façon équivalente à cette étude. Le troisième auteur a participé à 10% des travaux.

Short Title : MMP-9 and TGF- β in Elastocalcinosis

3.1. Résumé

L'hypertension systolique isolée est associée à une activité élastase accrue, à une calcification artérielle médiale et à une augmentation de la rigidité vasculaire. Notre objectif était de déterminer l'importance de l'activité élastase et de la dégradation de la matrice extracellulaire dans le développement de l'élastocalcinose.

Le développement de l'hypertension systolique isolée est induit *in vivo* et *ex vivo*, chez le rat, en utilisant la warfarine. Les paramètres hémodynamiques, l'accumulation de calcium, la dégradation de l'élastine, la signalisation du TGF- β et l'activité élastase ont été évalués entre 0 et 28 jour(s) de traitement à la warfarine. Les métalloprotéinases, sérine-protéases et cystéine-protéases ont été bloquées pour mesurer leur implication relative dans la dégradation de l'élastine. L'élastocalcinose et la dégradation de l'élastine ont progressé graduellement et parallèlement, pour atteindre des niveaux significatifs après 21 jours de traitement. L'activité de MMP-9 était augmentée après 5 jours de traitement, alors que la signalisation du TGF- β était accrue après 7 jours. Ces augmentations étaient transitoires. La calcification a pu être prévenue *in vivo* en bloquant l'activation des métalloprotéinases avec la doxycycline et *ex vivo* en bloquant la signalisation du TGF- β avec le SB-431542.

L'activation précoce de MMP-9 précède l'augmentation de la signalisation du TGF- β , l'apparition de l'élastocalcinose et l'augmentation de la rigidité artérielle dans le développement de l'hypertension systolique isolée. La modulation de la dégradation de la matrice extracellulaire pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique pour prévenir l'augmentation graduelle de la rigidité durant le vieillissement, qui mène à l'hypertension systolique isolée.

3.2. Abstract

Objective: Isolated systolic hypertension is associated with increased elastase activity, vascular calcification and vascular stiffness. We sought to determine the importance of elastase activity and matrix degradation in the development of elastocalcinosis.

Methods and Results: Elastocalcinosis was induced in vivo and ex vivo using warfarin. Hemodynamic parameters, calcium deposition, elastin degradation, TGF- β signaling and elastase activity were evaluated at different time points in the in vivo model. Metalloproteinases, serine proteases and cysteine proteases were blocked to measure their relative implication in elastin degradation. Gradual elastocalcinosis was obtained, and paralleled the elastin degradation pattern. MMP-9 activity was increased at 5 days of warfarin treatment, while TGF- β signaling was increased at 7 days. Calcification was significantly elevated after 21 days. Blocking metalloproteinases activation with doxycycline and TGF- β signaling with SB-431542 were able to prevent calcification.

Conclusions: Early MMP-9 activation precedes the increase of TGF- β signaling, and overt vascular elastocalcinosis and stiffness. Modulation of matrix degradation could represent a novel therapeutic avenue to prevent the gradual age-related stiffening of large arteries, leading to isolated systolic hypertension.

Condensed abstract

The objective was to determine the importance and timing of matrix degradation in relation to elastocalcinosis associated with enhanced vascular stiffness. Matrix degradation and its cellular signaling are essential to elastocalcinosis and precede elastin fragmentation, overt calcification and enhanced vascular stiffness. These early events could represent means to limit stiffening of large arteries.

Key words: Vascular calcification, Elastocalcinosis, elastases, extracellular matrix, MMP-9, TGF- β

3.3. Introduction

With aging, alterations of the vascular structure and function occur, including medial arterial calcification (medial elastocalcinosis MEC) or elastocalcinosis and elastin degradation¹. These modifications induce gradual stiffening of arteries that contributes to the development of isolated systolic hypertension (ISH), the predominant type of hypertension in elderly patients.

Elastocalcinosis is characterized by a deposition of hydroxyapatite on the elastic lamellae of arteries. It occurs independently of atherosclerosis². Until recently, it was considered as a passive process, taking place with time. However, several studies demonstrated that vascular calcification is an active phenomenon controlled by serum and matrix proteins, such as matrix Gla protein³. Moreover, it involves phenotypic changes of vascular smooth muscle cells with the expression of bone-related proteins⁴.

Aging is associated with an increased collagen/elastin ratio explained in part by an enhanced degradation of elastin^{5, 6}. Indeed, elastase activity, mainly endopeptidases, including cysteine proteases, serine proteases and metalloproteinases, is increased with age in human aortas⁷. In the context of aging and vascular calcification, metalloproteinases, especially matrix metalloproteinases (MMPs), have been thoroughly studied. Investigations on the genetic mutations of MMPs demonstrated its contribution to age-related large artery stiffening^{8, 9}. Furthermore, enhanced MMP-9 and MMP-2 levels and serum elastase activity were observed in patients with ISH and correlated independently with PWV¹⁰. In 2000, Vyavahare et al showed for the first time that elastin calcification was blunted by a site specific delivery of MMP inhibitor¹¹. Moreover, Qin *et al.* demonstrated, in an animal model, that matrix metalloproteinases inhibition with doxycycline and GM6001 decreased hydroxyapatite accumulation in the aorta¹². These results suggest that MMPs and elastin degradation are involved in MEC.

Elastin degradation induces the release of soluble elastin peptides and TGF- β 1¹³. These peptides interact with elastin-laminin receptor (ELR)¹⁴ and TGF- β receptor,

respectively. Simionescu *et al.* demonstrated that elastin peptides (through ELR) and TGF- β 1 induced phenotypic changes of VSMCs with osteogenic responses¹⁵. Moreover, TGF- β stimulated vascular cells with an osteogenic phenotype to calcify¹⁶.

Therefore, evidence is mounting that MMPs and elastin degradation are implicated in the calcification process. However, many questions remain unanswered. Indeed, we do not know the implication of MMPs in a physiopathological model that seems relevant to the human condition. Moreover, when the enzymes intervene in the process is also an open question. Finally, do MMPs act alone or do other elastases also contribute? This study aimed at answering these uncertainties. Our working hypothesis is that elastase activity and extracellular matrix degradation are essential to the early development of arterial elastocalcinosis in ISH and that MMPs are not the only elastases implicated.

In order to test this hypothesis, we used an animal model of arterial elastocalcinosis based on an impairment of matrix Gla protein (MGP) carboxylation, a protein able to prevent calcification. Recently, undercarboxylated MGP was associated with vascular calcification in patients¹⁷. High doses of warfarin were administered to prevent the vitamin K dependent MGP carboxylation, while bleeding was prevented by concomitant administration of phylloquinone (vegetal vitamin K quinone) used by the liver but not by the vessels for protein carboxylation. With this model, we previously observed a specific accumulation of hydroxyapatite on elastin fibers^{18, 19}. We also demonstrated an increased collagen/elastin ratio^{18, 20} and phenotypic changes in vascular wall demonstrated by changes in osteopontin expression²¹.

3.4. Methods

In vivo experiments

Treatments

Male Wistar rats (initial weight of 175-200g, n = 6-20 per group) were obtained from Charles River Breeding Laboratories (St-Constant, Qc, Canada). They received warfarin (20 mg. kg⁻¹. day⁻¹ in drinking water) and vitamin K (phylloquinone, 15 mg. kg⁻¹. day⁻¹ sub-cutaneous injection) (WVK) during 1, 3, 5, 7, 14, 21 and 28 days. Dosages were adjusted every second day. Controls consisted of age-matched untreated rats (Ctrl). In additional rats, doxycycline, a non-selective MMP inhibitor, was administrated (30 mg. kg⁻¹. day⁻¹, in the food) during 14 days, from day 1 to day 14 (WVK₂₈+Doxy₁₋₁₄) or day 15 to day 28 (WVK₂₈+Doxy₁₅₋₂₈) and during 28 days (WVK₂₈+Doxy₁₋₂₈), concomitantly with 28 days of WVK. All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal.

Hemodynamic parameters

Animals were anesthetized with pentobarbital (65 mg/kg) and short catheters (polyethylene-50, approx. 10 cm, Folioplast SA, France) were inserted into the distal abdominal aorta through the left femoral artery and into the aortic arch through the left carotid. Catheters were connected to a pressure transducer to allow the measurement of systolic (SBP) and diastolic blood pressures (DBP) at each location. Mean arterial blood pressure (MBP), as well as carotid and femoral pulse pressures (PP) were calculated from these parameters. Pulse wave velocity (PWV) was measured by the foot-to-foot method from the 2 signals, as previously described¹⁸. Finally, the aorta was harvested. Portions were frozen at - 80 °C for calcium amount, western blot analysis and elastases activity evaluation. A section of aorta was fixed in 4% cacodylate-buffered paraformaldehyde and embedded in paraffin blocks for histological evaluation.

Vascular wall composition

To measure calcium content, sections of the aorta were dried at 55°C and calcium was extracted with 10% formic acid (30 µL/mg of dry tissue) overnight at 4°C. The colorimetric quantification was achieved through a reaction with o-cresolphthalein (Teco Diagnostics, Anaheim CA, USA).

Fragmentation of the medial elastic fiber network (excluding the external and internal laminae) and calcium deposition were evaluated on 7-µm thick sections stained with Weigert solution²² and von Kossa, respectively. The number of elastin breaks was evaluated by a blinded observer.

Elastolytic activity

Proteins were extracted from aorta using 20 mM Tris HCl pH 7.5, 5mM EGTA, 150mM NaCl, 20mM Glycerophosphate, 10mM NaF, 1% Triton X-100, 0,1% Tween 20. Elastase activity was evaluated using EnzChek elastase activity assay kit (Molecular Probes by Invitrogen, Burlington, On, Canada). This kit contains DQ elastin that becomes fluorescent once digested by elastases and proteases. After incubation at 37°C during 18 hours, the fluorimetric reaction was revealed at 505/515 nm. The results were normalized with porcine pancreatic elastase and expressed as elastolytic activity of pancreatic elastase equivalent units. In order to determine the different families of elastases involved, anti-proteases were added to the samples: aprotinin (2µg/mL) for serine proteases, 1,10 phenanthroline (10mM) for metalloproteinases and E-64 (10µM) for cysteine proteases.

For western blot, immunoprecipitation and zymography analysis, proteins were extracted from rat aorta using 20mmol/L Tris HCl pH 7.5, 5mM EGTA, 150mM NaCl, 20mM Glycerophosphate, 10mM NaF, 1% Triton X-100, 1mM sodium orthovanadate, 0,1% Tween 20, 1 µg/mL aprotinin and 1mM PMSF²³.

MMPs and TIMPs activity

MMPs activity was measured by standard gelatin zymography. Sample, renaturation and incubation buffers were purchased from Biorad. SDS-polyacrylamide gels were incubated 36 hours at 37 °C. Active MMP-2 and MMP-9 were localized at 62kDa and 82 kDa respectively, and visualized as areas of lytic activity on an otherwise blue background. TIMPs activity was evaluated by reverse zymography. A mix of human MMP-2/MMP-9 (Chemicon Inc., Temecula, CA, USA) was incorporated into gelatin-containing zymogram gel at 0.13 µg/mL²⁴. Active TIMP-1 (27 kDa) and TIMP-2 (21 kDa) were visualized as undigested bands (dark blue) on an otherwise clear background. Activity was expressed in arbitrary units and normalized by control values (presented as 100).

Western blot

For western blot analysis, equal amounts of proteins (30 µg) were resolved by electrophoresis on 12% PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Afterward, membranes were incubated overnight at 4°C with Cbfa-1 antibody (Chemicon, 1: 200 in 5% nonfat milk). Following 4 washes of 5 min with TTBS, membranes were incubated with anti-rabbit secondary antibody (New England BioLabs, Pickering, On, Canada) 1: 2000 for 45 minutes at room temperature. Immunoreactive bands were then revealed with ECL reactive (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Qc, Canada) using the Typhoon scanner 9410. Protein loading normalization was established using a β-actin antibody 1: 5000 (Sigma, Oakville, On, Canada) and the results were expressed as percent change relative to controls.

For immunoprecipitation analysis, 350 µg of protein extracts from rat aorta were incubated overnight at 4 °C with polyclonal Smad 2/3 antibody (New England BioLabs, 1: 100). The immune complexes were then collected with protein G sepharose beads. Binding

of Smad 2/3 to Smad 4 was assayed by Western blot using Smad 4 antibody (New England BioLabs, 1: 1000) corrected by Smad 2/3 protein content.

Ex vivo experiments

Aortic segments of untreated Wistar rats were placed into DMEM (Hyclone by Fisher scientific, Whitby, On, Canada) containing 1.8 mM Ca^{2+} and 0.9 mM PO_4^{3-} with penicillin and streptomycin. Medium was maintained at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere and changed every 2 days. In order to induce calcification, 10 μM of warfarin was added to the medium. The concentration of PO_4^{3-} was increased to 3.8 mM, two days after the addition of warfarin. The aortic rings were placed in this medium with high PO_4^{3-} and warfarin during 4 days (CM). Thereafter, they were cleaned in PBS and frozen at -80°C or fixed in paraformaldehyde for paraffin sectioning. For viability staining, the aortic rings were incubated with 0.5 mg/mL methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) in DMEM for 3 hours at 37°C and washed in physiologic saline three times, and then embedded for frozen sectioning. Calcification was assessed by both von Kossa staining and colorimetric quantification.

In order to determine the implication of different families of elastases in vascular calcification, antiproteases were added to the media : aprotinin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for serine proteases, E-64 (10 μM) for cysteine proteases, 1,10 phenanthroline (10 mM) or doxycycline (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for metalloproteinases. Moreover, the addition of SB-431542 (10 μM), an inhibitor of activin receptor-like kinase, and lactose (5 mM), an elastin-laminin receptor antagonist allowed to evaluate the involvement of TGF- β 1 and elastin-derived peptides in this process.

Drugs and statistical analysis

All drugs were purchased from Sigma Chemical Co. unless specified otherwise. Values are expressed as mean \pm SEM. An ANOVA followed by Bonferonni's correction was used to compare the groups. We used the one sample t test and fixed control values at 100 in zymography analysis.

3.5. Results

In vivo experiments

Hemodynamic parameters

WVK treatment induced isolated systolic hypertension after 28 days. This was associated with an enhanced pulse pressure, suggesting increased arterial rigidity. In fact, an elevated vascular stiffness was observed by measuring the pulse wave velocity, a blood pressure independent parameter. From this method, gradual stiffening (PWV) of the aorta was observed with WVK treatment, reaching significance after 21 days (Figure 1A), while the maximum value was obtained after 28 days of treatment.

Vascular wall composition

Calcium content in the aorta followed a similar pattern as the one observed for PWV. Indeed, a gradual increase of vascular calcification was observed from day 7 to day 28 of WVK treatment. This increase was significant after 21 days of WVK treatment. However, the maximum value was not obtained until the 4th week of treatment (Figure 1A). This calcium deposition was localized on the elastic lamellae (Figure 1B).

The breaks in the elastic network of the vascular wall perfectly matched the kinetic defined by vascular calcification. As demonstrated in Table 1, this parameter was also significantly increased compared to controls after 21 days of WVK treatment, and reached its maximum after 28 days.

Figure 1

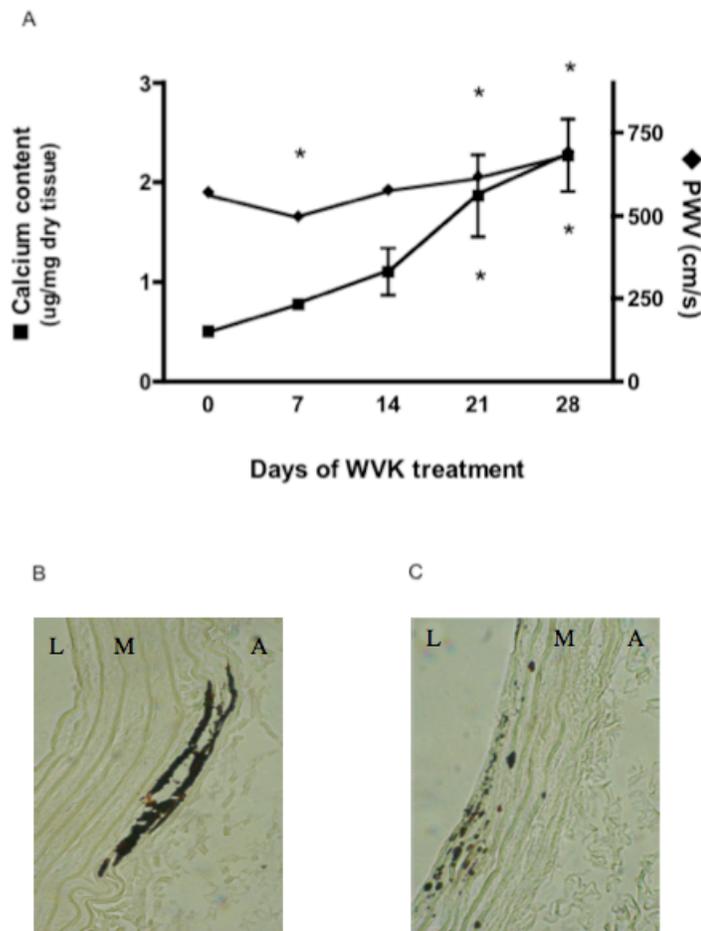


Figure 1: (A) Gradual calcification (squares) and vascular stiffening (PWV, diamonds) in the warfarin/vitamin K model. * $P < 0.05$ vs Ctrl. (B) Von Kossa staining of an aorta of a rat treated with WVK during 28 days and (C) of an aorta treated ex vivo with a calcifying medium during 4 days. L : lumen; M: media; A: adventitia

Phenotypic changes

In line with the increase in vascular calcification, we observed a time dependant increase in the expression of Cbfa-1, evaluated by western blot normalized with β -actin (n=5 per group). The increase reached significance after 21 days of WVK treatment (WVK 21days : 0.300 ± 0.035 vs Ctrl : 0.122 ± 0.017 , $p < 0.05$) and plateaued at 28 days (0.315 ± 0.053 , $p < 0.05$) (see supplemental data, figure A).

Ex vivo model of elastocalcinosis

To assess cell viability, aortic rings were incubated with MTT at the end of a six day culture period. The smooth muscle cells in the media of the vessels exposed to the calcifying media were stained. This did not differ from fresh aortas. Moreover, aortic rings exposed to a non-calcifying media presented a similar staining (data not shown). Incubation of aortic sections in DMEM with warfarin and high concentration of PO_4^{3-} induced a significant increase of calcium amount in the vascular wall (Ctrl: 0.35 ± 0.05 vs CM: 4.41 ± 1.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry tissue, $p < 0.05$). Von Kossa staining showed calcification on the elastin lamellae of aortas incubated in calcifying media (Figure 1C).

Elastolytic activity in vivo

Elastolytic activity was already increased after 7 days of WVK treatment, and the augmentation was significant and maximal after 14 days of WVK treatment (Figure 2A). At this time-point, 1,10-phenanthroline, the inhibitor of metalloproteinases, completely suppressed elastolytic activity (Figure 2B). However, serine and cysteine proteases inhibitors did not decrease significantly elastase activity at 14 days. 1,10-phenanthroline reduced elastolytic activity at all time-points (data not shown).

Figure 2

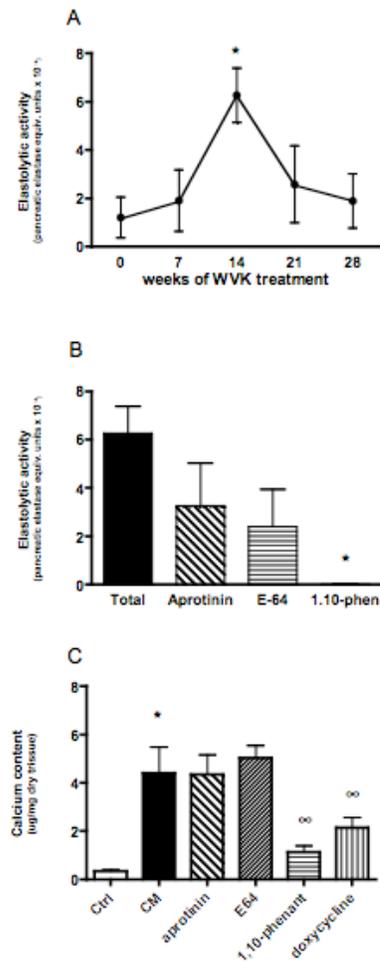


Figure 2: (A) Total elastase activity during elastocalcinosis development. (B) Elastin degradation at 14 days of WVK treatment, with or without elastase inhibitors. *P < 0.05 vs Total. (C) Effects of elastase inhibitors on ex vivo elastocalcinosis. Ctrl: control, CM: calcifying medium, treatment with 3.8 mM PO₄³⁻ and 10 µM warfarin during 4 days, aprotinin: 2 µg/mL of aprotinin associated with CM, E-64: 10 µM of E-64 associated with CM, 1,10-phenant: 1mM of 1,10-phenanthroline with CM and doxycycline: 100 µg/mL of doxycycline with CM. *P < 0.05 vs Ctrl, ∞ P < 0.05 vs CM.

Elastases implication ex vivo

In this direction, inhibition of different families of elastases demonstrated that only metalloproteinases seemed to be important in calcification, using our ex vivo model. Indeed, 1,10-phenanthroline and doxycycline, two nonselective inhibitors of metalloproteinases, significantly prevented calcification, whereas aprotinin and E-64 did not (Figure 2C).

MMPs and TIMPs activity in vivo

Gelatine zymography on aortic extracts allowed visualization of MMP-9 and MMP-2 activity. Whereas MMP-2 activity remained unchanged during WVK treatment, a transient and significant increase of MMP-9 activity was observed after 5 days of WVK treatment (Figure 3A). MMP-9 activity went back to a normal level at 14 days of WVK treatment. These variations of MMP activity were not associated with changes of TIMP-1 or TIMP-2 activity (data not shown).

The implication of metalloproteinases in the elastocalcinosis process was confirmed by doxycycline treatment in the rat model. When doxycycline was added to the WVK treatment, both calcium content (Figure 3B) and elastin fragmentation (Table 1) were significantly prevented with the three administrations regimen of doxycycline. However, only 28 days of doxycycline could successfully prevent the increase in vascular stiffness (Table 1). Indeed, administration of doxycycline for the first or second half of the WVK treatment had no effect on PWV. Moreover, 28 days of doxycycline partially reduced Cbfa-1 expression ($45 \pm 22\%$, ns).

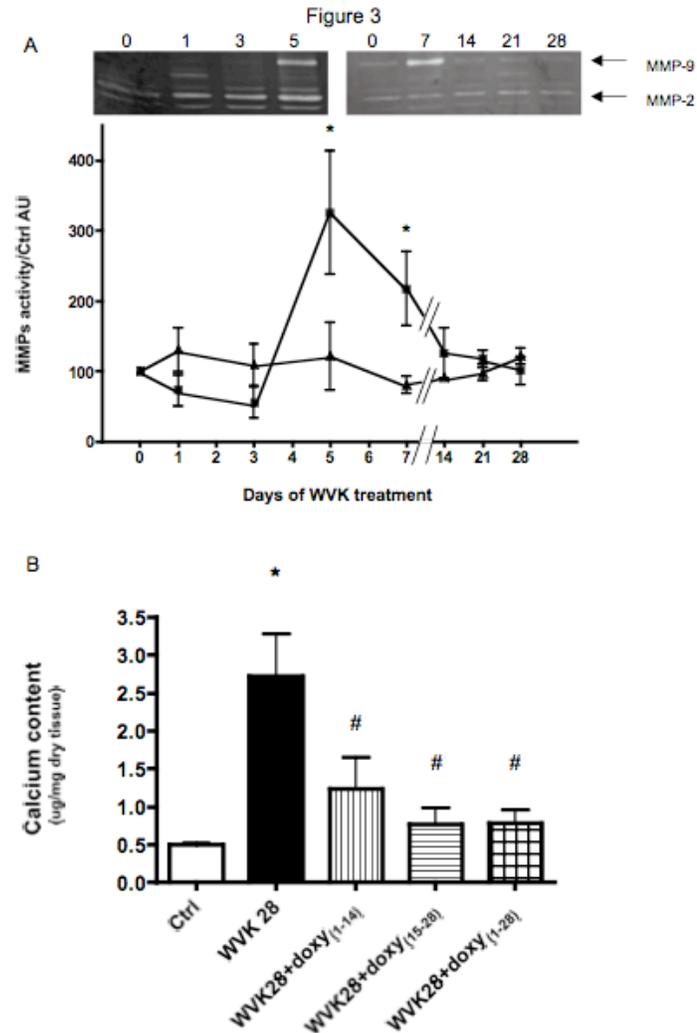


Figure 3: (A) Kinetic of MMP-9 (filled squares) and MMP-2 activity (filled triangles). The top panels are representative experiments at different time points. (B) Prevention of calcification by doxycycline used in different sequences. Ctrl: control; WVK₂₈: warfarin/vitamin K treatment for 28 days; WVK₂₈ + Doxy₁₋₁₄: doxycycline treatment for the first half of WVK₂₈; WVK₂₈ + Doxy₁₅₋₂₈: doxycycline treatment for the second half of WVK₂₈; WVK₂₈ + Doxy₁₋₂₈: doxycycline added to the WVK treatment for 28 days. *P < 0.05 vs Ctrl, #P < 0.05 vs WVK₂₈.

Table 1: Hemodynamic parameters and elastin breaks in the in vivo experiments

	Ctrl	WVK ₇	WVK ₁₄	WVK ₂₁	WVK ₂₈	WVK ₂₈₊ Doxy ₁₋₁₄	WVK ₂₈₊ Doxy ₁₅₋₂₈	WVK ₂₈₊ Doxy ₁₋₂₈
n=	40	20	20	20	20	8	11	6
SBP mmHg	141±3	132±3	140±5	141±4	155±4 *	160±8	153±4	141±7
DBP mmHg	104±3	95±4	95±4	100±3	105±3	113±7	113±4	104±7
MBP mmHg	119±2	107±4 *	112±4	113±3	123±3	134±5	126±4	116±7
PP mmHg	38±2	37±2	45±2 *	43±2	50±2 *	47±3	40±2 #	35±2 #
PWV cm.s ⁻¹	571±8	498±10*	578±15	618±13*	693±17*	711±26	678±18	605±37#
Elastin breaks/ 10 ⁴ um ²	0.14±0.05	0.22±0.07	0.34±0.10	0.59±0.09*	0.66±0.10*	0.16±0.04#	0.21±0.05#	0.20±0.04#

Ctrl: control; WVK_x: x days of warfarin/vitamin K treatment; Doxy: doxycycline treatment for 14 or 28 days in association with 28 day WVK treatment. *: $P < 0.05$ vs Ctrl; #: $P < 0.05$ vs WVK₂₈. ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons.

TGF- β signaling

TGF- β signaling, evaluated by smad 2/3 – smad 4 binding, increased in a rapid and transitory fashion. It reached significance as early as 7 days of WVK treatment and then returned to control levels (figure 4A).

The implication of some products of ECM degradation was evaluated with the use of lactose and SB-431542 (Figure 4B) ex vivo. This inhibitor of the kinase activity of TGF- β receptor prevented the increase of calcium deposition in our ex vivo model. However, lactose, an antagonist of elastin-derived peptides receptor, did not prevent aortic calcification, although it reduced ERK 1/2 phosphorylation, a downstream effector (Figure B, supplemental data). The association of lactose with SB-431542 produced a reduction of calcium amount similar to the one induced by SB-431542 alone.

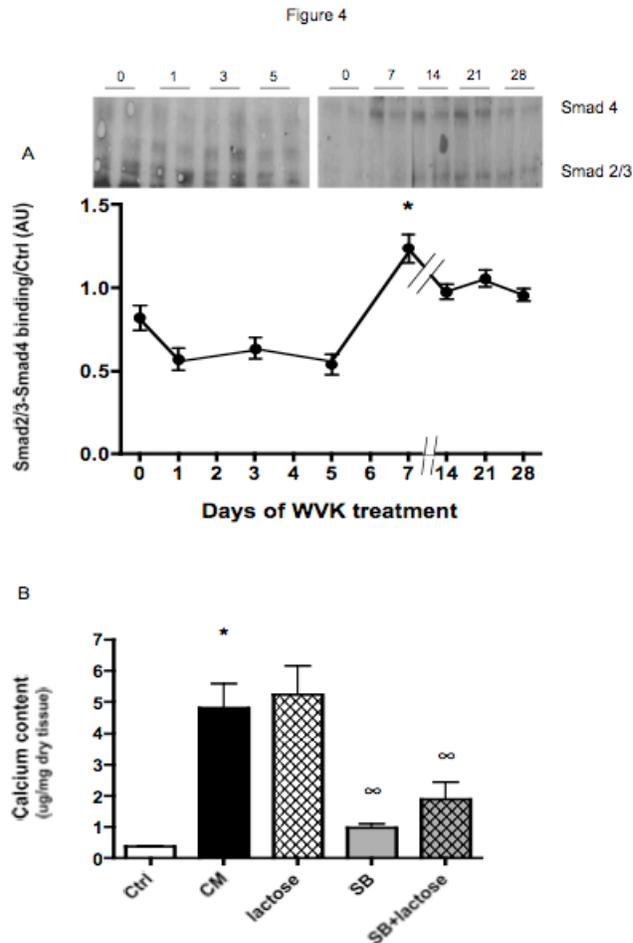
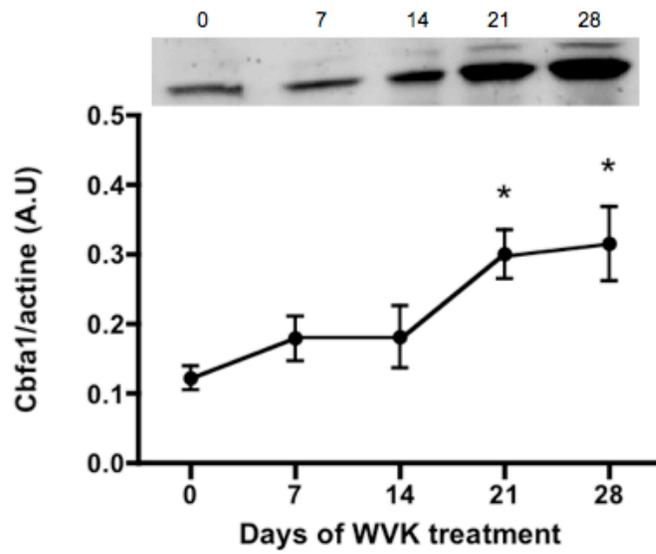
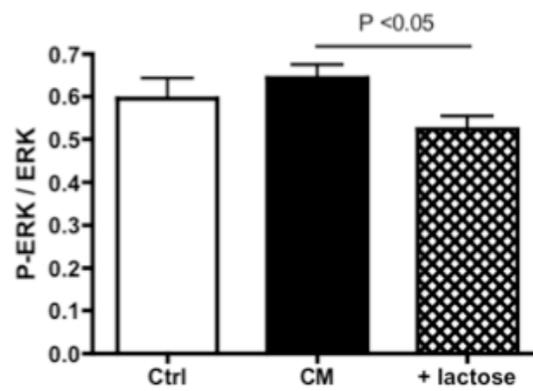


Figure 4: (A) Smad2/3 – Smad4 binding (part of TGF- β signaling) during the development of elastocalcinosis. Smad2/3 were immunoprecipitated followed by Smad4 immunoblotting. The top panels are representative experiments at different time points * $P < 0.05$ vs Ctrl. (B) Effect of the TGF- β inhibitor and ELR antagonist on ex vivo calcification. Ctrl: control; CM: calcifying medium; SB: 10 μ M of SB-431542 associated with CM; lactose: 5 mM of lactose associated with CM; SB + lactose: combination of SB-431542 and lactose in CM. * $P < 0.05$ vs Ctrl, $\infty P < 0.05$ vs CM.

Supplemental
Figure ASupplemental
Figure B

3.6. Discussion

Herein, we establish for the first time a sequence of extracellular matrix events taking place in the development of elastocalcinosis and vascular stiffness. Our results suggest an essential implication of early MMP-9 and TGF- β signaling, in the process.

WVK treatment *in vivo* increased systolic blood pressure (SBP) without diastolic blood pressure (DBP) change, thus increasing pulse pressure (PP). This was associated with increased calcification and elastin degradation, which were accompanied by increased PWV. Since these changes occur in humans with ISH^{18,19}, these data lend support to the validity of our model. However, a surprising observation was the transitory fall in PWV in WVK₇ rats compared to controls. This could be explained by the early activation of elastases, such as MMP-9, which could trigger matrix degradation prior to calcification, thus “loosening” the vascular walls. Interestingly, elastic arteries show two physical changes during aging. Before stiffening, arteries dilate. O’Rourke et al suggested that this dilation could be a consequence of fracture of elastic lamellae. Through a transfer of stresses to collagen, this fracture could participate also to arterial stiffening²⁵.

Elastin presents a high affinity for calcium²⁶. Seligman et al. demonstrated that elastin mineralization *in vitro* increased with the age of the individual from whom the vessel was obtained²⁷. This was associated with an augmentation of polar amino acids in the elastin samples from older patients²⁷⁻²⁹. Moreover, mineralized elastin was associated with a higher content of N-terminal amino acids, indicative of its degradation⁶. Therefore, elastin degradation seems to favor calcification through an increase of polarity, which enhances elastin affinity for calcium. The close association between elastin breaks and calcification observed in the present study lends support to this concept.

The degradation of elastin requires elastase activation. In our *in vivo* model of elastocalcinosis, we observed an increase after two weeks of WVK treatment. This elastase activity was persistently reduced by 1,10 phenanthroline, suggesting the implication of metalloproteinases, as measured by elastin DQ degradation. Among metalloproteinases, the metzincins and especially the matrix metalloproteinases (MMPs)

are the most studied. The involvement of MMPs in vascular calcification and elastin degradation has already been studied. Indeed, Bailey et al showed that pretreating elastin with AlCl_3 not only prevented its degradation by decreasing the activity of MMPs, but also reduced its subsequent calcification³⁰. Furthermore, Basalyga demonstrated, in an arterial injury model involving the periarterial application of calcium chloride (CaCl_2), that MMP knock-out mice were resistant to elastin degradation and calcification³¹. Thus, evidence is mounting to confirm the role of MMPs in the calcification process. Herein, we demonstrated that WVK treatment increased selectively MMP-9 activity in an acute and transient fashion, after only 5 days. The transient increase of MMP-9 activity cannot explain the significant augmentation of elastase activity after 14 days. Since, no change in MMP-2 activity was observed, other MMPs or metalloproteinases could be involved in this later phase, as suggested by the elastase activity assay. Indeed, these results ruled out significant implication of cysteine and serine proteases in the process of elastocalcinosis, and were confirmed with the *ex vivo* model of elastocalcinosis. In this *ex vivo* model, aprotinin was used to block serine proteases, E-64 to inhibit cysteine proteases and 1,10-phenanthroline and doxycycline to reduce metalloproteinases activity. Of the inhibitors examined, only the metalloproteinase inhibitors were able to partially prevent calcification, thus strengthening their implication in the process. Although the nature of the metalloproteinase involved later in the process needs to be resolved, we also have to rule out a potential direct binding of metalloproteinases inhibitors to calcium cations.

Recently, the implication of MMPs in calcification was also demonstrated in a vitamin D3 model, where their inhibition with either doxycycline or GM6001 prevented vascular calcification¹². Several mechanisms have been proposed for the actions of doxycycline, a tetracycline, on the extracellular matrix : direct inhibition of the enzyme, downregulation of gene transcription and alteration of enzyme processing associated with pro-MMP activation^{32, 33}. In our experiments, doxycycline prevented the development of calcification and elastin degradation when used during two weeks or during the whole duration of WVK treatment, confirming the central role of MMPs. However, only 28 days of doxycycline prevented the PWV increase, suggesting that not only elastin degradation

and calcification are implicated in arterial stiffness, but also fibrosis could intervene in this process³⁴.

As mentioned earlier, degraded elastin presents an increased affinity for calcium. However, extracellular matrix degradation by elastases also induces the release of soluble elastin peptides and TGF- β ¹³ that can influence the process of elastocalcinosis. Soluble elastin peptides present biological effects mediated by the ELR, leading to phenotypic changes characterized by the synthesis of bone proteins like type I collagen³⁵ and Cbfa-1¹⁵. TGF- β is a potent multifunctional regulator of cell growth and differentiation. TGF- β_1 , a member of the TGF- β superfamily, induces different cellular responses, including stimulation of osteogenesis³⁶. Following TGF- β binding to its receptor, the associated kinase, target of SB-431542, is activated and phosphorylates Smads. Once phosphorylated, Smad-2/3 interacts with co-Smad or Smad-4. This complex moves into the nucleus to stimulate the transcription of several target genes³⁷. Smads interact with Runx2/ Cbfa1, a transcription factor required in osteoblast gene expression, to increase its transactivation ability^{38, 39}. In the present experiments, a transient increase of Smad2/3-4 complex formation was observed early during the process of elastocalcinosis (after 7 days of WVK treatment), suggesting an enhanced stimulation of target genes, like Cbfa1. Although the current study does not show an increased transcriptional activity of Cbfa-1, we observed a significant increase of its expression after 3 weeks of WVK treatment, revealing a phenotypic modification in the vascular wall. Therefore, our results support a role for TGF- β in elastocalcinosis as suggested by Simionescu et al¹⁵. Indeed, experiments in the *ex vivo* model demonstrated that TGF- β inhibition prevented vascular calcification. It is suggested that a reduction in MGP carboxylation could lead to bone morphogenic protein (BMP)-2 release, that can also signal through Smads⁴⁰. However, immunohistochemistry was negative for BMP-2 in our model (data not shown) and the activation of Smads was transient, whereas MGP undercarboxylation was sustained.

In contrast to evidence presented by Simionescu, the elastin laminin receptor was not crucial for vascular calcification in our model. Indeed lactose, an ELR antagonist, had

no effect on aortic elastocalcinosis, although it blunted downstream signaling of the ELR. It is important to note that our *ex vivo* aortas maintained viability in culture, as determined with MTT, and that Von Kossa staining revealed the same calcification localization as our *in vivo* model experiments.

In summary, during the process of vascular medial elastocalcinosis, we observed acute MMP-9 activation, closely followed by the activation of TGF- β signaling. In fact, MMP-9 (activated at day 5) could release TGF- β from the extracellular matrix, inducing the activation of TGF- β signaling observed at day 7. At day 14, an increase of elastase activity by metalloproteinases could be responsible for gradual elastin degradation, augmented at day 14 and significant at day 21. *Ex vivo* experiments confirmed the crucial role played by MMP-9 and TGF- β signaling. The other elastases evaluated (cystein and serine proteases) were not implicated in elastocalcinosis nor elastin degradation. Through outside-in signaling, increased TGF- β and metalloproteinases could be associated with an increased expression of other proteins, such as endothelin. Previous studies demonstrated a role for endothelin and an increased expression of endothelin in calcified areas is observed at 14 days (unpublished data). Endothelin could be in part responsible for the phenotypic change of VSMCs (Cbfa-1 expression), associated with progressive increases of medial calcification and elastin fragmentation. Thus, this study brings to light a sequence of events leading, through several pathophysiological processes, to enhanced vascular stiffness and isolated systolic hypertension. Continuous research efforts are required to unravel the pathological process leading to large artery stiffness, which is a crucial step to allow the development of new therapies targeted at the arterial wall.

3.6.1. Acknowledgements

We acknowledge the skilled technical assistance of Louise Ida Grondin.

Sources of Funding

This study was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (Quebec chapter). CB received a studentship from the Rx&D/CIHR and SM from the Quebec Society of Hypertension. PM and DdB are scholars from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Disclosure

None.

3.7. References

1. Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res.* 2005;66:307-317.
2. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation.* 1999;100:2168-2176.
3. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1400-1407.
4. Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol.* 2000;89 Suppl 2:63-68.
5. Fulop T, Jr., Douziech N, Jacob MP, Hauck M, Wallach J, Robert L. Age-related alterations in the signal transduction pathways of the elastin-laminin receptor. *Pathol Biol (Paris).* 2001;49:339-348.
6. Spina M, Garbin G. Age-related chemical changes in human elastins from non-atherosclerotic areas of thoracic aorta. *Atherosclerosis.* 1976;24:267-279.
7. Hornebeck W, Derouette JC, Roland J, Chatelet F, Bouissou H, Robert L. [Correlation between age, arteriosclerosis and elastinolytic activity of human aorta wall]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1976;282:2003-2006.
8. Medley TL, Kingwell BA, Gatzka CD, Pillay P, Cole TJ. Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulation of gene and protein expression. *Circ Res.* 2003;92:1254-1261.
9. Medley TL, Cole TJ, Dart AM, Gatzka CD, Kingwell BA. Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1479-1484.
10. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:372.
11. Vyavahare N, Jones PL, Tallapragada S, Levy RJ. Inhibition of matrix metalloproteinase activity attenuates tenascin-C production and calcification of implanted purified elastin in rats. *Am J Pathol.* 2000;157:885-893.

12. Qin X, Corriere MA, Matrisian LM, Guzman RJ. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1510-1516.
13. Hindson VJ, Ashworth JL, Rock MJ, Cunliffe S, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: identification of amino- and carboxy-terminal cleavage sites. *FEBS Lett.* 1999;452:195-198.
14. Labat-Robert J. Cell-matrix interactions in aging: role of receptors and matricryptins. *Ageing Res Rev.* 2004;3:233-247.
15. Simionescu A, Philips K, Vyavahare N. Elastin-derived peptides and TGF-beta1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:524-532.
16. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest.* 1994;93:2106-2113.
17. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A, Reutelingsperger CP, Cleutjens JP, Vermeer C. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1629-1633.
18. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens.* 2003;16:103-110.
19. Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD, Moreau P. Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation.* 2005;112:1628-1635.
20. Dao HH, Essalihi R, Graillon JF, Lariviere R, De Champlain J, Moreau P. Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens.* 2002;20:1597-1606.
21. Essalihi R, Ouellette V, Hao Dao H, McKee MD, Moreau P. Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells During Medial Arterial Calcification: a Role for Endothelin? *Journal of cardiovascular pharmacology.* 2004;44:S147-S150.
22. Gaillard V, Casellas D, Seguin-Devaux C, Schohn H, Dauca M, Atkinson J, Lartaud I. Pioglitazone improves aortic wall elasticity in a rat model of elastocalcinotic arteriosclerosis. *Hypertension.* 2005;46:372-379.
23. Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, Wassef M, Esposito B, Tedgui A. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:E120-126.

24. Bendeck MP, Nakada MT. The beta3 integrin antagonist m7E3 reduces matrix metalloproteinase activity and smooth muscle cell migration. *J Vasc Res.* 2001;38:590-599.
25. O'Rourke MF, Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1-13.
26. Rucker RB. Calcium binding to elastin. *Adv Exp Med Biol.* 1974;48:185-209.
27. Seligman M, Eilberg RF, Fishman L. Mineralization of elastin extracted from human aortic tissues. *Calcif Tissue Res.* 1975;17:229-234.
28. Lansing AI, Rosenthal TB, Alex M, Dempsey EW. The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *Anat Rec.* 1952;114:555-575.
29. Nejjar I, Pieraggi MT, Thiers JC, Bouissou H. Age-related changes in the elastic tissue of the human thoracic aorta. *Atherosclerosis.* 1990;80:199-208.
30. Bailey M, Pillarisetti S, Jones P, Xiao H, Simionescu D, Vyavahare N. Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification. *Cardiovasc Pathol.* 2004;13:146-155.
31. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation.* 2004;110:3480-3487.
32. Ryan ME, Ashley RA. How do tetracyclines work? *Adv Dent Res.* 1998;12:149-151.
33. Uitto VJ, Firth JD, Nip L, Golub LM. Doxycycline and chemically modified tetracyclines inhibit gelatinase A (MMP-2) gene expression in human skin keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;732:140-151.
34. Essalihi R, Zandvliet ML, Moreau S, Gilbert LA, Bouvet C, Lenoel C, Nekka F, McKee MD, Moreau P. Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens.* 2007;25:1879-1886.
35. Tummalapalli CM, Tyagi SC. Responses of vascular smooth muscle cell to extracellular matrix degradation. *J Cell Biochem.* 1999;75:515-527.
36. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev.* 1994;15:27-39.
37. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390:465-471.
38. Zhang YW, Yasui N, Ito K, Huang G, Fujii M, Hanai J, Nogami H, Ochi T, Miyazono K, Ito Y. A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA1 mutation displaying

impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10549-10554.

39. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM, Bae SC. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol*. 2000;20:8783-8792.
40. Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev*. 2001;21:274-301.

4. Transglutaminase 2 : A Key Element in the Development of Vascular Calcification Associated with Isolated Systolic Hypertension

Simon Moreau¹, Nicolas Chabot, PhD.², Amina Mulani², Céline Bouvet, Pharm D., PhD.¹, Jeffrey W. Keillor, PhD.², and Pierre Moreau, PhD¹.

¹Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

²Department of chemistry, Faculty of Arts and Sciences, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Le premier auteur a contribué majoritairement aux travaux (80% du travail). Les deuxième, troisième et quatrième auteurs ont réalisé 20% des expériences.

Ce manuscrit est en préparation

4.1. Résumé

La transglutaminase 2 est associée à la calcification vasculaire, une composante de la rigidité artérielle impliquée dans le développement de l'hypertension systolique isolée avec l'âge. Cependant, un rôle direct dans le développement de la calcification artérielle médiale n'a pas été démontré à ce jour.

Une calcification artérielle médiale graduelle a été obtenue dans des modèles in vivo, ex vivo (aortes en culture) et in vitro (cellules musculaires lisses vasculaires). Un nouvel inhibiteur de la TG2, le 052, a eu un effet marqué sur le développement de la calcification ex vivo et in vitro. De plus, en bloquant la fonction endolysosomale, un processus connu pour dégrader la TG2, avec la chloroquine, la calcification a augmenté in vitro. L'activation de la voie de signalisation de la β -catenin, associée à une phosphorylation de GSK3 et une régulation à la baisse de l'expression de p21, a été observée dans les 3 modèles de calcification. Ceci semble se produire via la liaison de TG2 à LRP5. L'activité de cette cascade de signalisation est limitée par le 052 et l'inhibition de la signalisation du TGF- β , impliqué de façon précoce dans le développement de la calcification vasculaire.

La transglutaminase 2 est un élément important dans le développement de la calcification artérielle médiale. Cette étude fait de la transglutaminase, et les événements signalitiques qui lui sont associés, une cible potentielle dans la prévention ou le traitement de la rigidité artérielle et l'hypertension systolique isolée.

4.2. Abstract

Objective : Transglutaminase 2 has been linked to vascular calcification, a component of vascular stiffness involved in the development of isolated systolic hypertension with age. However, a direct role has yet to be confirmed in the development of medial arterial calcification.

Methods and Results : Gradual medial calcification was obtained in *in vivo*, *ex vivo* (aortic culture) and *in vitro* (vascular smooth muscle cell culture) models. A novel TG2 inhibitor (052) had a marked effect on the development of calcification both *ex vivo* and *in vitro*. Moreover, blocking endolysosomal function with chloroquine, a process known to inactivate TG2, enhanced calcification *in vitro*. β -catenin signaling, characterized by increased phosphorylation of GSK3 and down-regulation of p21 expression, was observed in all 3 models of vascular calcification. This seemed to occur through the binding of TG2 to LRP5. The activity of this signaling cascade was limited by 052 and also by TGF- β inhibition, an early player in vascular calcification development.

Conclusions : Transglutaminase 2 is an essential element in the development of medial arterial calcification, making it, and its associated signaling events, a potential target in the prevention or the treatment of vascular stiffness and isolated systolic hypertension.

Condensed abstract

Inhibition of transglutaminase 2 by a novel compound prevents the development of medial arterial calcification. It also reduces TG2 binding to LRP5 and downstream signaling through the β -catenin pathway. Transglutaminase 2 is an attractive target for future therapies aimed at controlling medial arterial calcification.

Key words : Transglutaminase 2, vascular calcification, GSK3, β -catenin, LRP5

4.3. Introduction

As a consequence of aging, large arteries undergo arteriosclerosis: they become stiffer, predominantly due to medial calcification, also known as medial elastocalcinosis, and fibrosis. Medial calcification is known to occur independently of atherosclerosis^{1, 2}. It is an active phenomenon controlled by proteins, such as matrix Gla protein (MGP), and involves the phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells (VSMCs)^{3, 4}. This leads to the deposition of hydroxyapatite crystals on the elastic lamellae of arteries. The fragmentation of these lamellae increases with age⁵ and enhances their affinity for calcium^{6, 7}. Thus, medial calcification is amplified with aging. Elastic lamellae fragmentation also contributes to stiffness. Indeed, it participates, along with collagen accumulation in the extracellular matrix, to the increase in collagen/elastin ratio⁸. Since collagen is 100-1000 times more rigid than elastin⁹, this increased ratio is linked to the common characteristic of aging arteries, namely enhanced stiffness.

Increased rigidity of large conduit arteries has hemodynamic consequences that lead to the development of isolated systolic hypertension (ISH), the most common form of hypertension in the elderly¹⁰. To study the underlying mechanisms of ISH, we have adapted an animal model known as the warfarin – vitamin K (WVK) model¹¹. It is based on hindering the carboxylation of a physiological inhibitor of calcification, MGP. Warfarin is administered to rats to disable the vitamin K-dependant activation of MGP. Bleeding is prevented by the concomitant administration of phylloquinone¹². Using this model, we have previously demonstrated increased vascular calcification, fibrosis, stiffness (pulse wave velocity), pulse pressure and systolic blood pressure¹³. More recently, we established a sequence of events taking place during the development of elastocalcinosis¹⁴. We demonstrated an early involvement of MMP-9 and TGF- β signaling that preceded Cbfa-1 (runx-2) overexpression, overt calcification and arterial stiffening by one to two weeks (in a 4-week process). Our current objective is to identify a potential cellular or extracellular matrix component linking these early events to the late events.

Transglutaminase 2 (TG2) is a calcium dependant enzyme catalyzing the post-translational modification of proteins resulting in ϵ -(γ -glutamyl)-lysine crosslinks. Some of the best known substrates of TG2 include collagen I and fibronectin¹⁵. TG2 has been associated with fibrosis^{16,17} and has been shown to play an important part in mineralization processes. Indeed, TG2 has long been implicated in bone development and formation^{15, 18-20}. More recently, TG2 was associated with vascular calcification²¹⁻²³. Johnson et al showed that TG2^{-/-} SMCs displayed a decreased expression of calcification-promoting genes and an increased expression of physiological calcification inhibitors²². Favermann and colleagues also revealed that TG2 could bind to LRP5, co-receptor of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, and induce the activation of β -catenin in mice VSMCs to promote calcification²³. More recently we provided histological evidence that TG2 was activated early and located to areas of calcification in the aorta of WVK treated rats²⁴. In terms of its regulation, Zemskov et al. proposed that TG2 abundance can be limited by its internalization and lysosomal degradation via LRP1, a member of the LDL receptor superfamily²⁵.

Our current working hypothesis is that TG2 plays a crucial role in the development of vascular calcification associated with ISH, and could represent the next event to relay TGF- β signaling to induce later events taking place in the development of this pathology. To test this hypothesis, we evaluated the impact of inhibiting either TG2 itself, with a novel irreversible inhibitor, or its degradation on calcification. Wnt/ β -catenin signaling through LRP5 was also investigated as a downstream signaling cascade.

4.4. Methods

In Vivo Experiments

Treatments

Male Wistar rats weighing 175-200 g (n = 6 – 20 per group) were obtained from Charles River Breeding Laboratories (St-Constant, Qc, Canada). They received warfarin (20 mg/kg/day in drinking water) and vitamin K (phylloquinone, 85 mg/kg/day sc injection) (WVK) during 1, 2, 3, and 4 week(s). Dosages were adjusted every second day. Controls consisted of age-matched untreated rats (Ctrl). Animals were sacrificed with a lethal dose of pentobarbital (65 mg/kg) and the aorta was harvested and frozen at -80 °C. All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal.

Calcium amount

Calcium was measured on aortic sections dried at 55 °C, after extraction of calcium with 10 % formic acid (30 µL/mg of dry tissue) overnight at 4 °C. Using a kit from Teco Diagnostics (Anaheim, CA, USA), calcium was quantified colorimetrically after reacting with o-cresolphthalein.

Western Blots

For western blot analysis, proteins were extracted from rat aorta using 20 mM Tris HCl (pH 7.5), 5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 20 mM glycerophosphate, 10 mM NaF, 1 % Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 0.1 % Tween 20, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin and 1 mM PMSF. Equal amounts of proteins (30 µg – 50 µg) were resolved by electrophoresis on 7.5 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Subsequently, membranes were incubated overnight at 4 °C with pGSK3 (Santa Cruz 1 : 200), GSK3 (Santa Cruz, 1 : 1000), LRP5 (Santa Cruz, 1 : 200), LRP1 (Progen, 0.5 µg/mL)

or p21 (Santa Cruz, 1 : 500) antibody. Following 3 washes of 10 min in TTBS, membranes were incubated with the corresponding secondary antibody for 1 h at room temperature. Immunoreactive bands were then revealed with ECL reactive (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Qc, Canada) using the Typhoon scanner 9410. Protein loading normalization was established using a β -actin antibody 1 : 5000 (Sigma, Oakville, On, Canada) and the results were expressed as percent change relative to controls. For pGSK3, HRP activity of the secondary antibody (anti-goat) was inhibited with 1,5 mM NaN_3 ²⁶, loading normalization was then established using the GSK3 antibody, raised in mouse.

Ex vivo experiments

Treatments

Aortic segments harvested from untreated Wistar rats (350-375 g, n = 6-20) were placed into DMEM (Hyclone by Fisher scientific, Whitby, On, Canada) containing 1.8 mM Ca^{2+} and 0.9 mM PO_4^{3-} with penicillin and streptomycin. Medium was maintained at 37 °C in a 5 % CO_2 atmosphere and changed every 2 days. In order to induce calcification, warfarin was added to a final concentration of 10 μM and, two days later, the concentration of PO_4^{3-} was increased to 3.8 mM. The aortic rings placed in this calcification medium (CM) with high PO_4^{3-} and warfarin were harvested after 1 (CM1), 2 (CM2), 3 (CM3) or 4 (CM4) day(s). Thereafter, they were cleaned in PBS and frozen at -80 °C. Calcification was assessed by colorimetric quantification, as described above.

In order to determine the importance of TG2 in vascular calcification, 052, a specific inhibitor of TG2²⁴ (10 μM) (CM4 + 052) or SB-431542 (Sigma, 10 μM) an inhibitor of TGF- β signaling (CM4 + SB) were added to the medium from day 1 (CM1) to day 4 (CM4).

Western blots

Proteins were extracted using 1 % Triton, 150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 % IGEPAL Co-630, 1 mM sodium orthovanadate, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin and 1 mM PMSF. They were then processed as in the in vivo section.

In vitro experiments

Treatments

Primary VSMCs were isolated from the aortas of 350-375 g rats. Cultured cells were identified as VSMCs by staining for the smooth muscle specific α -actin (Sigma). Cells were used for calcification studies at passages 3 through 10. Cells were cultured in DMEM (Hyclone by Fisher Scientific, Whitby, On, Canada) with penicillin and streptomycin. To induce calcification, cells were cultured in the presence of 3 mM PO_4^{3-} for 7 days (CM, calcification medium). Purified guinea pig liver TG2 (0.01 U/mL, Sigma) (CM + TG), chloroquine (2.5 μM , Sigma) (CM + Chloro), an inhibitor of endolysosomal function²⁵, both (CM + Chloro + TG), or 052 (10 μM)(CM + 052), were added to the medium. Calcification was assessed by colorimetric quantification.

Western Blots and co-immunoprecipitation

Proteins were extracted using 1% Triton, 150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 % IGEPAL Co-630, 1 mM sodium orthovanadate, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin and 1 mM PMSF. We then proceeded according to the in vivo description.

For co-immunoprecipitation studies, 350 μg of protein extracts were incubated overnight at 4 °C with LRP5 antibody (Santa Cruz, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The immune complexes were then collected with protein G sepharose beads (Amersham). Binding of TG2 to LRP5 was assayed by Western blot using TG2 antibody (Neomarkers, 1 :1000) corrected by LRP5 protein content.

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm SEM. One sample *t* tests with either control or CM values fixed at 100% were used to test for statistical significance. We used an ANOVA followed by Bonferonni's correction to compare groups for calcium amounts describing our in vivo and ex vivo models of calcification.

4.5. Results

Vascular calcification models

In vivo, the calcium content in the aorta gradually increased from week 1 to week 4 of WVK treatment. The increase was significant after 3 weeks of WVK treatment, and continued to progress at 4 weeks (Figure 1A). A similar profile was observed in the ex vivo model, although the time-course was in days and not weeks (Figure 1B). In vitro calcification was also significantly present after 7 days in CM conditions (Figure 1C).

Importance of TG2 in vascular calcification associated with ISH

When TG2 was added to the culture medium in vitro, we did not observe any change in vascular calcification, compared to CM (Figure 2A). However, when endolysosomal function was blocked in VSMCs with chloroquine, a significant 60% increase in calcification resulted. Adding TG2 and chloroquine concomitantly raised calcium values even further by an additional 33%. The specific and irreversible inhibitor of TG2, 052, decreased calcification by 54%, when added to the culture medium of VSMC. Even more strikingly, 052 produced an 88% reduction of vascular calcification in the ex vivo model (Figure 2B).

Binding of TG2 to LRP5 is prevented by 052

These next studies were performed to confirm that TG2 could bind LRP5 and activate β -catenin²³, and to determine if the inhibition of TG2 could affect this binding. Herein, we observed an increased binding of TG2 to LRP5 in CM compared to controls (Figure 3). As could be expected from calcification measurements, adding TG2 to CM did not increase TG2-LRP5 binding. However, the combination of chloroquine and TG2 tended to increase the binding of TG2 to LRP5. Interestingly, 052 was able to diminish this binding by more than 75%, compared to CM. Studying the expression of LRP5 and LRP1 in vivo, we found

Figure 1

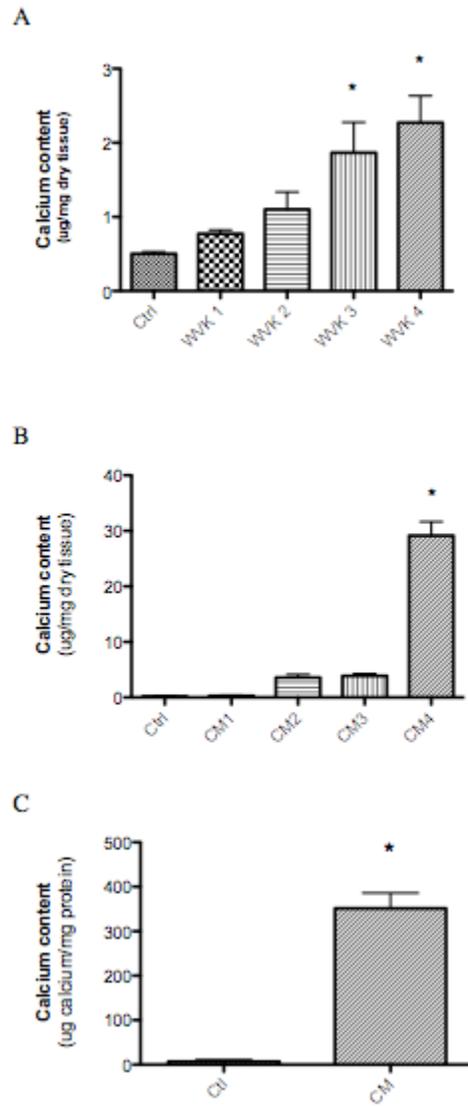


Figure 1 : Time course of elastocalcinosis in the warfarin/vitamin K model in vivo (A) and in rat aortas induced by warfarin and PO_4^{3-} ex vivo (B). Calcification of rat aortic VSMCs induced by PO_4^{3-} after 7 days of culture (C). * $p < 0.05$ vs Ctrl.

that LRP1 expression decreased after 1, 2 and 3 weeks of treatment as compared to control animals (supplemental data), while LRP5 expression remained unchanged (supplemental data).

Figure 2

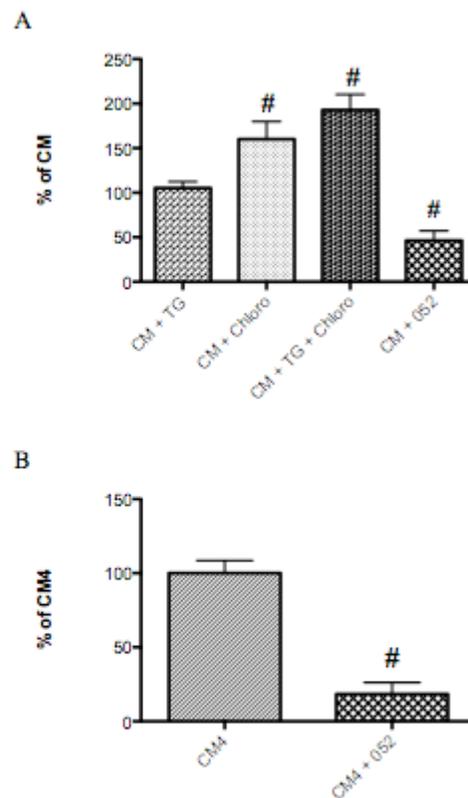


Figure 2 : (A) Evaluation of different treatment conditions added to CM in vitro : TG2 0.01 U/mL (CM + TG), Chloroquine 2.5 μ M (CM + Chloro), Chloroquine and TG2 (CM + Chloro + TG) and 052 10 μ M (CM + 052). (B) Impact of adding 052 (10 μ M) to the calcification medium (CM4) ex vivo. #p < 0.05 vs CM or CM4.

Figure 3

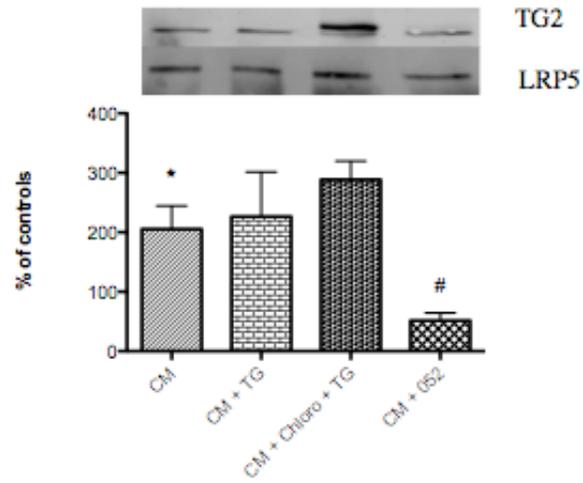


Figure 3 : Binding of TG2 to LRP5 in vitro in different treatment conditions : Calcification medium (CM), CM and TG2 (CM + TG2), CM, chloroquine and TG2 (CM + Chloro + TG2), CM and 052 (CM + 052). * $p < 0.05$ vs Ctl, # $p < 0.05$ vs CM.

Impact of 052 inhibitor downstream of LRP5

To truly establish a link between TG2, Wnt/ β -catenin pathway and vascular calcification in our models, we looked at 2 different markers of β -catenin activation. First, we tested if GSK3 was phosphorylated on serine 9, as an inactivation mechanism. Interestingly, pGSK3 was increased at 2 and 3 weeks of treatment in our in vivo model of vascular calcification (Figure 4A). We then looked at the expression of p21, which is down-regulated upon β -catenin activation, as a second marker of this pathway. We observed a decreased expression of p21 in vivo (Figure 4B). Studying our ex vivo model, we observed an increased phosphorylation of GSK3 after 4 days in CM conditions (Figure 4C), while p21 was decreased accordingly, after 3 and 4 days (Figure 4D). When 052 was added to the calcifying medium, the phosphorylation of GSK3 and the expression of p21 were similar to control values (Figures 4C and D).

Link between TGF- β and TG2

In the current study, we wanted to verify if the inhibition of TGF- β could prevent the activation of Wnt/ β -catenin signaling. Therefore, we added SB-431542 to the CM ex vivo and measured both phosphorylation of GSK3 and p21 expression. Interestingly, SB-431542 was able to prevent GSK3 phosphorylation (Figure 5A) and down-regulation of p21 expression (Figure 5B).

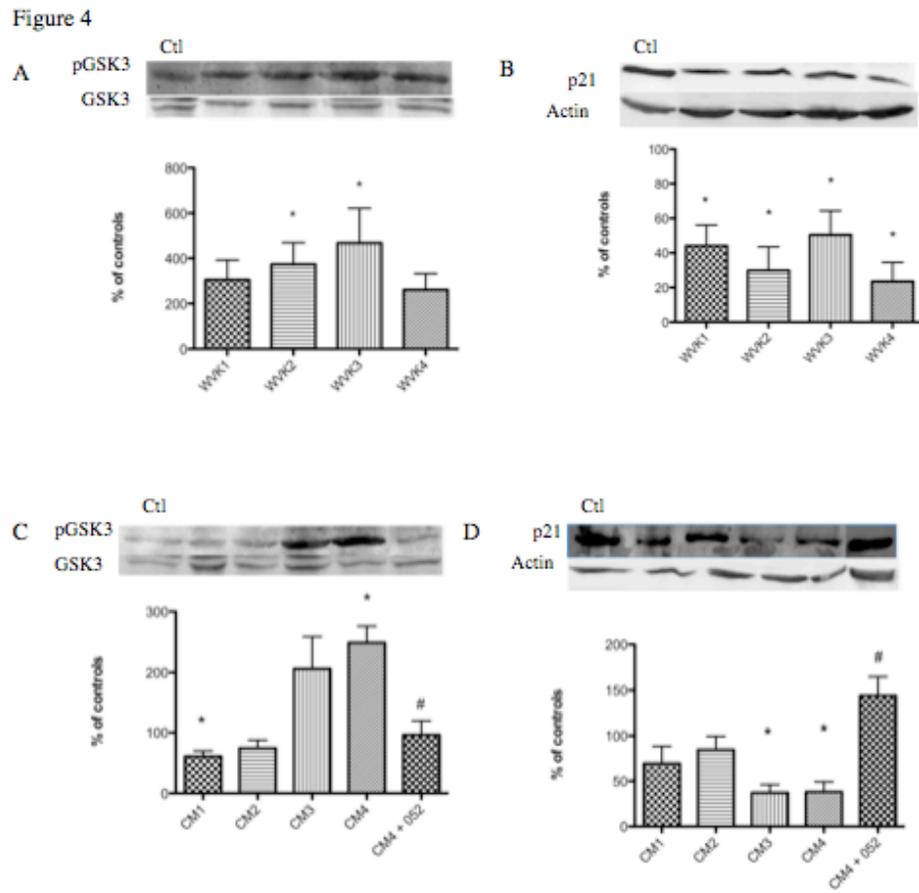


Figure 4: Western blots evaluating the phosphorylation of GSK3 (pGSK3) and the expression of p21 in the warfarin/vitamin K model in vivo (A and B) and in calcification medium ex vivo (C and D). * $p < 0.05$ vs Ctl, # $p < 0.05$ vs CM4.

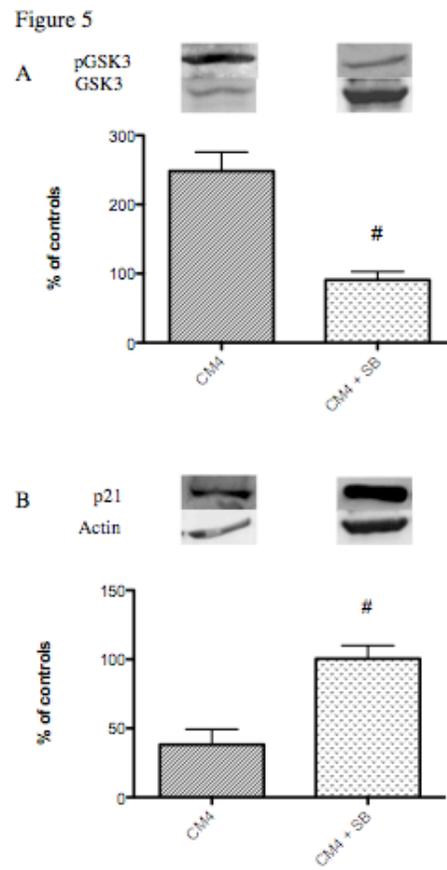
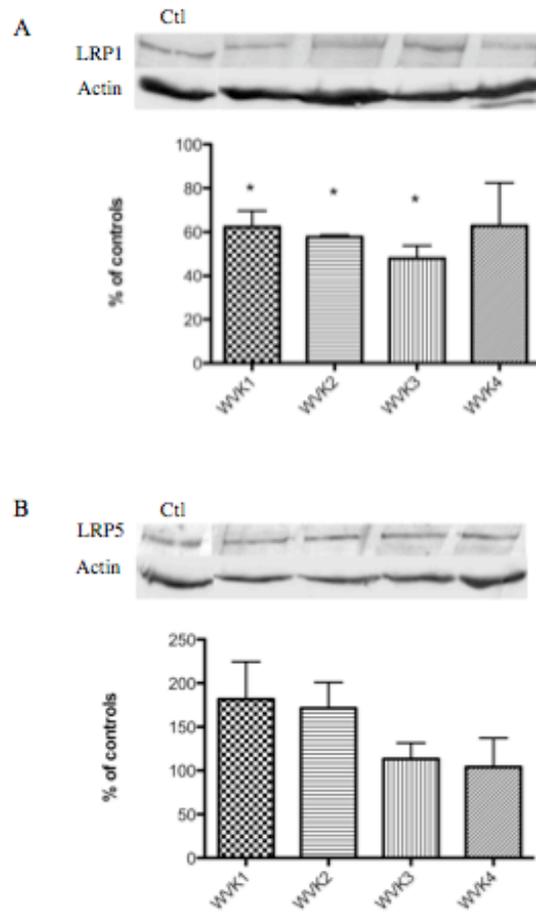


Figure 5 : Modulation of GSK3 phosphorylation (A) and p21 expression (B) by SB-431542 (10 μ M), an inhibitor of TGF- β signaling, evaluated ex vivo by Western blot. # $p < 0.05$ vs CM4.

Supplemental data

Figure 1 : Expression of LRP1 (A) and LRP5 (B) in the warfarin – vitamin K model. *p < 0.05 vs Ctrl.



4.6. Discussion

In the present study, we identified TG2 as a key regulator of vascular calcification in association with an *in vivo* model of ISH. We also suggest that TG2 might be an important link between early and late events associated with the pathology. To our knowledge, it is also the first study to show an effect of blocking endolysosomal activity on vascular calcification, through the modulation of TG2. Finally, we demonstrate the therapeutic potential of a new specific inhibitor of TG2 in the context of vascular calcification.

In vivo, WVK treatment increased vascular calcification significantly after 3 weeks, which continued to progress at week 4. We have previously shown that these modifications were associated with increased vascular stiffness, leading to the elevation of systolic blood pressure, which also occur in human ISH²⁷. We have previously demonstrated that our *ex vivo* model induced a similar pattern of medial calcification as we observed *in vivo* by staining aortic sections with Von Kossa¹⁴. As compared to our *in vivo* model, calcification takes place within 4 days instead of 4 weeks, and this model also offers the possibility of testing inhibitors that are not suitable for *in vivo* use. Moreover, drugs are tested on a whole tissue, with its intact tridimensional matrix. We consider this an advantage over cell-culture models, although the latter facilitates the study of specific signaling pathways.

We have previously published a study characterizing a new irreversible inhibitor of TG2²⁴. Furthermore, this inhibitor, known as 052, did not bind to FXIIIa, a member of the TG family involved in blood coagulation and wound healing²⁸, as demonstrated by fluorescent labeling on a SDS-PAGE. It is thus, to our knowledge, the first inhibitor to show a specific affinity for TG2. Furthermore, when used as a probe by coupling the inhibitor to rhodamine, we showed increased fluorescent labeling of TG2, especially in areas of vascular calcification on external elastic lamellae, which are characteristically undulated¹³. In the present experiment, we studied the effect of this inhibitor on vascular calcification. Our *ex vivo* results show a dramatic decrease in vascular calcification. The effect was also significant when 052 was added to the calcifying media *in vitro*. This clearly showed how crucial TG2 is to vascular calcification. We also tested the impact of

exogenous TG2 on calcification in vitro by adding 0.01 U/mL of TG2 to our CM condition. Surprisingly, we did not observe an amplification of calcification. This differs with what Favermann et al observed in their model, where exogenous TG2 increased calcification 3-fold²³. This could be ascribed to methodological differences. First, our primary cultures were obtained from rat aortic VSMCs instead of mice. Secondly, we only added PO_4^{3-} to our medium, and not ascorbic acid nor CaCl_2 . Finally, our calcification levels were much higher (300-400 $\mu\text{g Ca}^{2+}/\text{mg protein}$ vs 50 $\mu\text{g Ca}^{2+}/\text{mg protein}$), potentially masking the effect of exogenous TG2. We also believe that the regulation of TG2 through LRP1-dependant endolysosomal degradation observed by Zemskov and colleagues²⁵ might explain our results. Indeed, as discussed, TG2 alone did not increase calcification, even when we doubled its concentration*. However, when we added chloroquine, calcification increased significantly, and even more so when TG2 and chloroquine were added together. Taken together, these data suggest that, at least in this in vitro model, LRP1 is able to internalize exogenous TG2 added to the medium for subsequent degradation, thus modulating TG2 effects on vascular calcification. Since it has been demonstrated previously that LRP1 expression declines with age²⁹, we were curious to study its modulation in our in vivo model, with the postulate that if LRP1 regulates TG2, TG2-mediated effects, including calcification, could increase with age. Our results revealed that LRP1 is indeed down-regulated after 1, 2, and 3 weeks of treatment with warfarin.

Thus, LRP1 down-regulation could very well play a part in calcification events by allowing enhanced TG2 abundance and activity, something we previously reported in vivo²⁴. More evidence for a protective role of LRP1 comes from Boucher et al., who demonstrated that loss of LRP1 in VSMCs in vivo leads to a Marfan-like syndrome with TGF- β activation and elastic fiber fragmentation³⁰, a phenomenon also observed in our model¹⁴.

* Unpublished observation

The binding of extracellular TG2 to LRP5 has recently been identified in mouse VSMCs²³. Here, we show that it is also the case in rat VSMCs and that the binding increases in calcifying conditions (CM) compared to control conditions. However, when exogenous TG2 is added to the CM, there is no added binding. This correlates with our hypothesis that LRP1-dependant internalization and degradation of TG2 is capable of regulating exogenous TG2 activity. However, in the presence of both TG2 and chloroquine, there is a strong tendency towards an increased binding of TG2 to LRP5, supporting the importance of TG2 degradation in regulating its activity. Finally, when TG2 was blocked with 052, we observed a decrease of TG2-LRP5 binding, suggesting that the catalytic domain, inactivated by 052, is necessary for LRP5 binding. Alternatively, 052 binding could modify the conformation of TG2 and reduce its binding affinity. In any case, our results provide evidence that the mechanism of action (inhibition of calcification) of 052 involves altered TG2 binding to LRP5.

As demonstrated elegantly by Favermann and colleagues for the first time in 2008, TG2-LRP5 binding leads to β -catenin activation in in vitro vascular calcification. In line with these results, some markers of Wnt/ β -catenin signaling activation were measured. We first examined the phosphorylation of GSK3 on serine 9, which is increased upon Wnt/ β -catenin activation. This phosphorylation step inactivates GSK3 and allows β -catenin to move to the nucleus for transcription activity³¹⁻³³. PI3K/Akt can also induce the phosphorylation of GSK3 β on this serine residue³⁴⁻³⁵. However, when we blocked PI3K with wortmannin ex vivo, we did not observe any effect on vascular calcification, suggesting that this pathway is not involved in our model*. We noted that GSK3 phosphorylation was increased significantly after 4 days of CM in the ex vivo model, and after 2 weeks of WVK treatment in vivo. Interestingly, when 052 was added to the medium of the ex vivo model, this augmentation was prevented. The second signaling element we studied is p21. This protein is consistently down-regulated upon β -catenin activation³⁶. We observed a significant reduction of p21 expression both in vivo and ex vivo. Moreover, in

* Unpublished observation

line with the effect on GSK3, the addition of 052 prevented the response in the ex vivo model.

Taken together, we provide evidence to support the hypothesis that in vascular calcification, TG2 binds to LRP5 and induces activation of β -catenin that can in turn translocate to the nucleus and activate the expression of target genes implicated in vascular calcification, such as Cbfa-1³⁷ and ET-1³⁸⁻⁴⁰. Moreover, this signaling pathway also targets genes that are involved in fibrosis^{38, 41-43}. This is of interest to us since fibrosis is a critical player of arterial stiffness associated with ISH. Indeed, we have shown in a previous study that regression of vascular calcification was insufficient to overcome vascular rigidity, due to the stimulation, by calcification, of vascular fibrosis¹³. Since TG2 plays a part not only in vascular calcification but also in fibrosis^{16, 17, 44}, we think that it is a key molecule to target in order to prevent the development of this complex pathology. Incidentally, inhibiting TG2 has been shown to protect against fibrosis and preserve kidney function in models of chronic kidney disease and diabetic nephropathy^{45, 46}.

We have previously published the time course of events taking place in the onset of vascular calcification, leading to ISH after enhanced vascular stiffness. One of the early events was the activation of TGF- β signaling¹⁴. However, we observed a temporal gap between this early activation (1 week) and the induction of Cbfa-1 or ET-1 (3-4 weeks). Previous reports suggest that TGF- β can activate TG2^{47, 48}. To test this sequence of events in our models of vascular calcification, we used the inhibitor of TGF- β signaling, SB-431542, and studied downstream events (we have previously reported that this inhibitor blunts calcification in our ex vivo model¹⁴). We postulated that, if TG2 lies downstream of TGF- β , we should observe effects similar to the ones obtained with 052, when measuring GSK3 phosphorylation and p21 expression. Indeed, when SB-431542 was added to the CM in our ex vivo conditions, we noted a normalization of Wnt/ β -signaling. This lends support to our hypothesis that TG2 is activated by TGF- β to play a determinant role in the development of vascular calcification, and potentially fibrosis, associated with ISH.

One limitation of our study is that we were unable to test 052 in vivo, owing to its limited solubility. Current studies are underway to modify its structure, to increase its solubility

without altering its pharmacological profile, prior to further characterization of its in vivo behavior (absorption, pharmacokinetics, etc...). We hope that a second generation of compounds will thus allow us to measure the impact of TG2 not only on vascular calcification, but also on vascular stiffness, which we did not measure ex vivo. However, the observation that GSK3 phosphorylation and p21 down-regulation also occur in vivo strongly suggests that the same mechanisms we revealed in vitro and ex vivo are involved in our in vivo model as well.

In conclusion, we propose that TG2 plays a central role in the development of vascular calcification, through LRP5 binding and β -catenin signaling. Using a novel TG2 inhibitor, we were able to provide direct evidence for this sequence of events. We also provide evidence for an important role of LRP1 in scavenging TG2, thus limiting its deleterious signaling in the vasculature. Moreover, we have linked these new observations with our previous study pointing to TGF- β as an early player in the development of vascular calcification and as a potential stimulus for TG2 overexpression. Therefore, we believe that TG2 is a worthwhile therapeutic target to pursue in an effort to limit the damage associated with vascular stiffness and the resulting isolated systolic hypertension.

4.6.1. Acknowledgements

We acknowledge the skilled technical assistance of Louise Ida Grondin

Sources of Funding

This study was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). SM received a studentship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). CB received a studentship from Rx&D/CIHR. NC and AM are grateful for bursaries from the FRSQ-supported Groupe de recherche universitaire sur les médicaments (GRUM).

Disclosure

None

4.7. References

1. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation*. 1999;100:2168-2176.
2. Atkinson J. Age-related medial elastocalcinosis in arteries: mechanisms, animal models, and physiological consequences. *J Appl Physiol*. 2008;105:1643-1651.
3. Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol*. 2000;89 Suppl 2:63-68.
4. Schurgers LJ, Cranenburg EC, Vermeer C. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost*. 2008;100:593-603.
5. Atkinson J. [Aging of arterial extracellular matrix elastin: etiology and consequences]. *Pathol Biol (Paris)*. 1998;46:555-559.
6. Spina M, Garbin G. Age-related chemical changes in human elastins from non-atherosclerotic areas of thoracic aorta. *Atherosclerosis*. 1976;24:267-279.
7. Rucker RB. Calcium binding to elastin. *Adv Exp Med Biol*. 1974;48:185-209.
8. Johnson CP, Baugh R, Wilson CA, Burns J. Age related changes in the tunica media of the vertebral artery: implications for the assessment of vessels injured by trauma. *J Clin Pathol*. 2001;54:139-145.
9. Greenwald SE. Ageing of the conduit arteries. *J Pathol*. 2007;211:157-172.
10. Lee HW, Karam J, Hussain B, Winer N. Vascular compliance in hypertension: therapeutic implications. *Curr Diab Rep*. 2008;8:208-213.
11. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens*. 2003;16:103-110.
12. Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell

- system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost.* 1999;82:1764-1767.
13. Essalihi R, Zandvliet ML, Moreau S, Gilbert LA, Bouvet C, Lenoel C, Nekka F, McKee MD, Moreau P. Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens.* 2007;25:1879-1886.
 14. Bouvet C, Moreau S, Blanchette J, de Blois D, Moreau P. Sequential activation of matrix metalloproteinase 9 and transforming growth factor beta in arterial elastocalcinosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:856-862.
 15. Al-Jallad HF, Nakano Y, Chen JL, McMillan E, Lefebvre C, Kaartinen MT. Transglutaminase activity regulates osteoblast differentiation and matrix mineralization in MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Matrix Biol.* 2006;25:135-148.
 16. Johnson TS, Griffin M, Thomas GL, Skill J, Cox A, Yang B, Nicholas B, Birckbichler PJ, Muchaneta-Kubara C, Meguid El Nahas A. The role of transglutaminase in the rat subtotal nephrectomy model of renal fibrosis. *J Clin Invest.* 1997;99:2950-2960.
 17. Griffin M, Smith LL, Wynne J. Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. *Br J Exp Pathol.* 1979;60:653-661.
 18. Nurminskaya M, Kaartinen MT. Transglutaminases in mineralized tissues. *Front Biosci.* 2006;11:1591-1606.
 19. Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:140-156.
 20. Aeschlimann D, Wetterwald A, Fleisch H, Paulsson M. Expression of tissue transglutaminase in skeletal tissues correlates with events of terminal differentiation of chondrocytes. *J Cell Biol.* 1993;120:1461-1470.
 21. Kaartinen MT, Murshed M, Karsenty G, McKee MD. Osteopontin upregulation and polymerization by transglutaminase 2 in calcified arteries of Matrix Gla protein-deficient mice. *J Histochem Cytochem.* 2007;55:375-386.

22. Johnson KA, Polewski M, Terkeltaub RA. Transglutaminase 2 is central to induction of the arterial calcification program by smooth muscle cells. *Circ Res.* 2008;102:529-537.
23. Faverman L, Mikhaylova L, Malmquist J, Nurminskaya M. Extracellular transglutaminase 2 activates beta-catenin signaling in calcifying vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 2008;582:1552-1557.
24. Chabot N, Moreau S, Mulani A, Moreau P, Keillor J. Fluorescent Probes of Tissue Transglutaminase Reveal Its Association with Arterial Stiffening. *Chemistry and Biology.* 2010;17:1143-1150.
25. Zemskov EA, Mikhailenko I, Strickland DK, Belkin AM. Cell-surface transglutaminase undergoes internalization and lysosomal degradation: an essential role for LRP1. *J Cell Sci.* 2007;120:3188-3199.
26. Kaufmann SH. Reutilization of immunoblots after chemiluminescent detection. *Anal Biochem.* 2001;296:283-286.
27. Izzo JL, Jr. Arterial stiffness and the systolic hypertension syndrome. *Curr Opin Cardiol.* 2004;19:341-352.
28. Bergamini CM, Griffin M, Pansini FS. Transglutaminase and vascular biology: physiopathologic implications and perspectives for therapeutic interventions. *Curr Med Chem.* 2005;12:2357-2372.
29. Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ, Wagner SL, Troncoso JC, Kawas CH, Katzman R, Koo EH. Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest.* 2000;106:1159-1166.
30. Boucher P, Li WP, Matz RL, Takayama Y, Auwerx J, Anderson RG, Herz J. LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGFbeta and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome. *PLoS One.* 2007;2:e448.
31. Stambolic V, Woodgett JR. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J.* 1994;303 (Pt 3):701-704.

32. Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* 2004;29:95-102.
33. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997;11:3286-3305.
34. Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol.* 2009;156:885-898.
35. Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res.* 2007;32:577-595.
36. Kamei J, Toyofuku T, Hori M. Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312:380-387.
37. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem.* 2005;280:33132-33140.
38. Kapoor M, Liu S, Shi-wen X, Huh K, McCann M, Denton CP, Woodgett JR, Abraham DJ, Leask A. GSK-3beta in mouse fibroblasts controls wound healing and fibrosis through an endothelin-1-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2008;118:3279-3290.
39. Essalihi R, Ouellette V, Dao HH, McKee MD, Moreau P. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during medial arterial calcification: a role for endothelin? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44 Suppl 1:S147-150.
40. Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD, Moreau P. Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation.* 2005;112:1628-1635.
41. Konigshoff M, Balsara N, Pfaff EM, Kramer M, Chrobak I, Seeger W, Eickelberg O. Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2008;3:e2142.

42. Chen S, McLean S, Carter DE, Leask A. The gene expression profile induced by Wnt 3a in NIH 3T3 fibroblasts. *J Cell Commun Signal.* 2007;1:175-183.
43. Bowley E, O'Gorman DB, Gan BS. Beta-catenin signaling in fibroproliferative disease. *J Surg Res.* 2007;138:141-150.
44. Small K, Feng JF, Lorenz J, Donnelly ET, Yu A, Im MJ, Dorn GW, 2nd, Liggett SB. Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophy phenotype independent of phospholipase C activation. *J Biol Chem.* 1999;274:21291-21296.
45. Johnson TS, Fisher M, Haylor JL, Hau Z, Skill NJ, Jones R, Saint R, Coutts I, Vickers ME, El Nahas AM, Griffin M. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:3078-3088.
46. Huang L, Haylor JL, Hau Z, Jones RA, Vickers ME, Wagner B, Griffin M, Saint RE, Coutts IG, El Nahas AM, Johnson TS. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2009;76:383-394.
47. Shin DM, Jeon JH, Kim CW, Cho SY, Lee HJ, Jang GY, Jeong EM, Lee DS, Kang JH, Melino G, Park SC, Kim IG. TGFbeta mediates activation of transglutaminase 2 in response to oxidative stress that leads to protein aggregation. *FASEB J.* 2008;22:2498-2507.
48. Quan G, Choi JY, Lee DS, Lee SC. TGF-beta1 up-regulates transglutaminase two and fibronectin in dermal fibroblasts: a possible mechanism for the stabilization of tissue inflammation. *Arch Dermatol Res.* 2005;297:84-90.

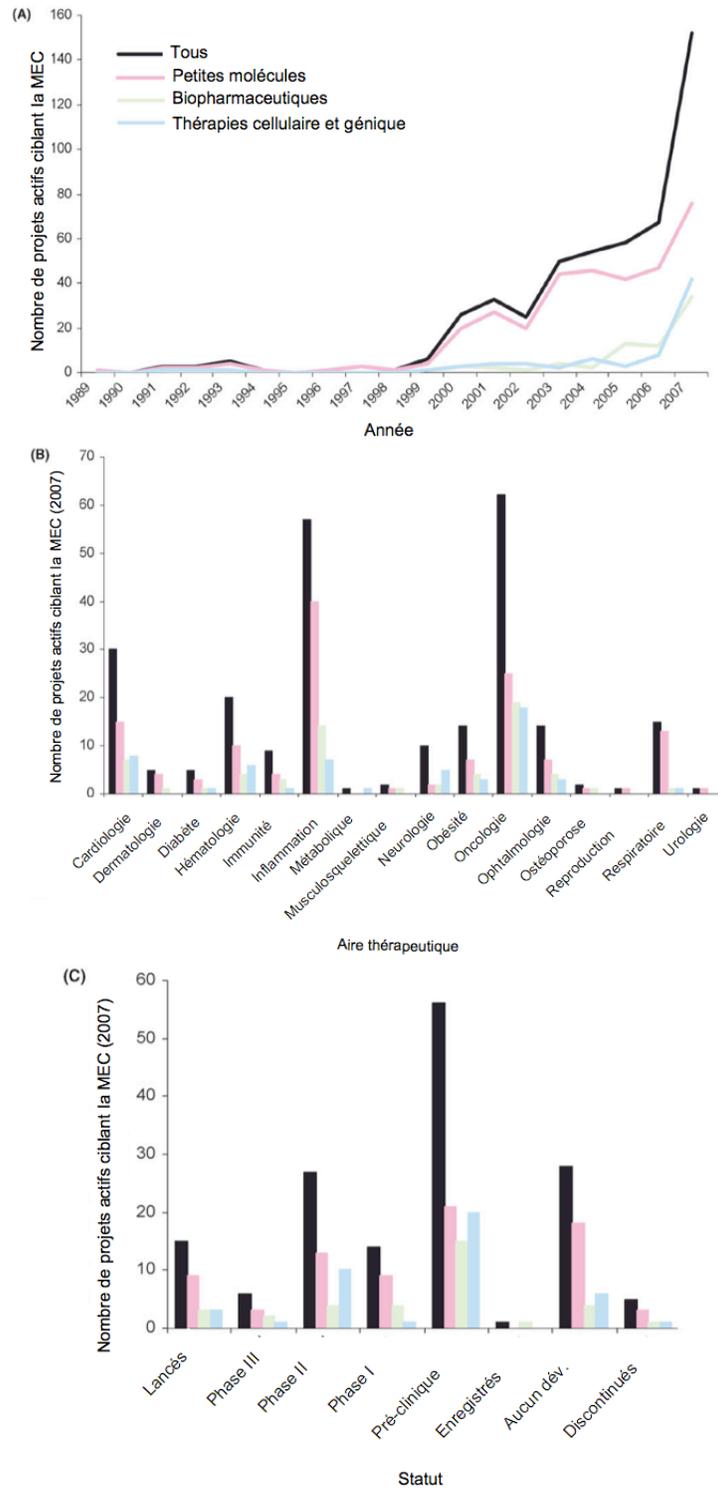
Discussion et conclusion

La matrice extracellulaire a longtemps été considérée comme une entité inerte, composée de différentes molécules et procurant aux organes et tissus une force mécanique. Aujourd'hui, la conception que nous avons de la matrice extracellulaire a évolué en une structure dynamique interagissant avec les cellules et générant des signaux qui affectent leur comportement⁵⁰². De plus, les modifications entraînant la dégradation ou le remaniement de ses constituants en font un environnement essentiel à la croissance, au développement et au remodelage des tissus. De même, l'altération de ces processus dynamiques est directement associée au développement de plusieurs pathologies, ce qui fait de la matrice extracellulaire une cible thérapeutique d'intérêt²⁶.

Toutes les pathologies sont sans doute reliées, que ce soit de façon quantitative ou qualitative, à une modification de la matrice extracellulaire. Cependant, il est important de distinguer les changements de la MEC qui cause la maladie, de ceux résultant de la pathologie, puisque les stratégies thérapeutiques vont être différentes en fonction d'une cause primaire ou secondaire⁵⁰². Présentement, il n'y a que peu de médicaments ciblant directement des composantes de la matrice extracellulaire. Les mieux connus sont possiblement l'abciximab, l'efalizumab et le natalizumab, qui ciblent les intégrines. Ils sont utilisés dans le traitement du syndrome coronarien aigu, du psoriasis et de la sclérose en plaques, respectivement⁵⁰³⁻⁵⁰⁵. Plusieurs autres médicaments influencent la dynamique de la MEC au-delà de leur cible primaire. Cependant, l'effet sur la matrice est souvent faible et peu spécifique, en plus d'avoir plusieurs effets délétères.

Dans les dernières années, le nombre de projets de développement de médicaments ciblant directement la matrice extracellulaire a augmenté. Les trois principales stratégies utilisées sont les petites molécules, les biopharmaceutiques ainsi que les thérapies cellulaires et géniques. En 2007, les petites molécules constituaient environ 50% des projets de développement actifs, tandis que les biopharmaceutiques ainsi que les thérapies cellulaires et géniques représentaient l'autre 50%. Les aires thérapeutiques de ces projets étaient multiples, et différents statuts de développement avaient été atteints (Figure 32).

Figure 32: Projets de développement de médicaments ciblant la MEC



Adapté de ²⁶

Ces médicaments ciblent principalement la synthèse de la matrice extracellulaire ou sa dégradation. Mes travaux de doctorat ont mis l'accent sur deux cibles de la synthèse de matrice extracellulaire : le TGF- β et la TG2, et une cible de la dégradation de la matrice extracellulaire, les MMPs. Les prochaines sections discuteront des stratégies présentement utilisées et des stratégies envisageables pour bloquer ces trois cibles.

A. Cibles au niveau de la synthèse de la matrice extracellulaire

a. Le TGF- β

En ciblant la synthèse de la matrice extracellulaire, le but est d'empêcher la fibrose. Cette accumulation de protéines matricielles, essentiellement du collagène, via une synthèse accrue ou une stabilisation intermoléculaire par la formation de liaisons covalentes, est impliquée dans plusieurs pathologies humaines, dont l'hypertension systolique isolée. En effet, la fibrose vasculaire est un des éléments, qui, avec l'âge, contribuent à l'augmentation de la rigidité artérielle. Durant mon doctorat, nous avons observé l'implication de deux facteurs pro-fibrotiques dans le développement de la rigidité artérielle: le TGF- β (Résultats, partie 1) et la transglutaminase 2 (Résultats, partie 2). Le TGF- β , en plus de participer à la fibrose vasculaire, est également impliqué dans des désordres fibrotiques au niveau du coeur, des reins, du foie, des poumons et de la peau⁵⁰⁶. Il constitue donc une cible intéressante pour un traitement anti-fibrotique. Par ailleurs, les travaux effectués pendant mon doctorat ont également permis d'identifier le TGF- β comme un élément clé de la calcification vasculaire. En effet, un inhibiteur de l'activité kinase associée au récepteur du TGF- β a pu prévenir le développement de la calcification dans une adaptation ex vivo du modèle warfarine-vitamine K (Résultats, partie 1). Le TGF- β a donc un rôle à jouer sur les deux composantes majeures de la rigidité artérielle, soit la fibrose et la calcification vasculaires.

Les interventions visant les réponses au TGF- β sont nombreuses, et sont utilisées dans des contextes pathologiques différents. D'abord, il est possible de bloquer le TGF- β

lui-même à l'aide d'anticorps neutralisants, tels le metelimumab (anti-TGF β 2), utilisé dans la sclérodémie⁵⁰⁷, et le lerdelimumab (anti-TGF β 1), utilisé dans l'amélioration du résultat de la chirurgie pour un glaucome. Ces anticorps, synthétisés par Cambridge Antibody Technology (CAT), ont cependant été discontinués en Phase I et III, respectivement⁵⁰⁸. Présentement, deux autres anticorps sont en Phase I, le GC-1008 de CAT et Genzyme⁵⁰⁹, et un anticorps de Eli Lilly⁵¹⁰. Il est également possible d'employer des récepteurs solubles du TGF- β , qui ont notamment démontré une efficacité dans l'éradication de cellules tumorales dans un modèle de souris⁵¹¹. D'autres protéines liant le TGF- β , comme la décorine, peuvent aussi être utilisées pour le bloquer directement⁵¹².

Une deuxième stratégie consiste à bloquer l'activation du récepteur ou l'activation de la signalisation en aval à l'aide de petites molécules à base d'imidazole ou de pyrazole⁵⁰⁸. Cette stratégie a été utilisée durant mon doctorat avec le SB-431542, qui inhibe l'activité kinase du récepteur au TGF- β . Le SD-208 est un autre inhibiteur pouvant remplir la même fonction⁵¹³. Présentement, aucune donnée clinique n'est disponible en ce qui a trait aux petites molécules, mais une nouvelle molécule de Eli Lilly est présentement en Phase I de développement⁵¹⁰.

Une autre stratégie consiste à utiliser des oligonucléotides antisens pour empêcher la synthèse de TGF- β . Antisense Pharma développe présentement le trabedersen, qui a démontré une amélioration de la survie, par rapport à la chimiothérapie conventionnelle, pour le traitement d'un gliome de grade élevé en Phase IIb⁵¹⁴. Ce produit est présentement en Phase III. Un autre oligonucléotide d'Antisense Pharma, AP 11014, ciblant le TGF- β 1, est présentement étudié en Phase pré-clinique. Ainsi, les études en cours pourraient permettre le développement d'un médicament efficace et sécuritaire pour l'utilisation chez l'homme.

b. La transglutaminase 2

La seconde cible pro-fibrotique identifiée durant mon doctorat est la transglutaminase 2. En effet, une étude effectuée pendant ma formation a démontré l'activation de la transglutaminase dans le développement de l'hypertension systolique isolée⁵¹⁵. Or, comme le suggèrent mes travaux, son implication dans la pathologie de l'hypertension systolique isolée ne se limite pas à la fibrose. En effet, nous avons montré le rôle clé de la transglutaminase dans la calcification vasculaire associée à cette pathologie. L'inhibiteur que nous avons utilisé, le 052, se lie de façon spécifique et irréversible à la transglutaminase 2. Cette liaison bloque l'activité catalytique de la TG2, ce qui signifie que la formation de liens covalents par cette enzyme est inhibée et suggère que la fibrose induite par la TG2 est limitée par le 052.

Par ailleurs, la formation de liaisons covalentes induite par la transglutaminase 2 n'est pas seulement associée à la fibrose. Elle est également impliquée dans certaines maladies neurodégénératives. En effet, l'agrégation de β -amyloïde et tau dans la maladie d'Alzheimer, de α -synucléine et de corps de Lewy dans la maladie de Parkinson et de la protéine huntingtin dans la maladie de Huntington est associée à une activité accrue de TG2 au niveau du cerveau⁵¹⁶⁻⁵¹⁹. Les inhibiteurs compétitifs de la TG2, comme la cystamine et le monodansylcadavérine, sont souvent utilisés dans des études in vitro et in vivo. Ils ont effectivement démontré des effets bénéfiques dans des modèles de maladies de Parkinson et de Huntington⁵²⁰⁻⁵²³. Or, ces inhibiteurs ont des effets non spécifiques qui ont également montré des bénéfices dans le traitement de la maladie de Huntington. En effet, une étude a démontré que l'effet bénéfique de la cystamine sur la dysfonction motrice et la survie était indépendant de l'inhibition de l'activité de la TG2⁵²⁴. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, serait donc plus utile pour déterminer l'impact de l'inhibition de la TG2 dans ces pathologies. Le 052, qui a été utilisé durant mon doctorat, est, à ma connaissance, la première molécule à lier spécifiquement TG2⁵¹⁵. En effet, plusieurs inhibiteurs se lient également au FXIII. Or, l'inhibition de cette enzyme peut entraîner des problèmes de coagulation⁵²⁵ et de cicatrisation⁵²⁶. La modification de la structure du 052 en fera donc un

candidat de médicament particulièrement intéressant pour traiter l'hypertension systolique isolée, mais également les maladies neurodégénératives, les désordres fibrotiques, la maladie coeliaque et le cancer, où l'activité de la TG2 est accrue^{527, 528}.

La liaison de la TG2 au co-récepteur LRP5/6 de la voie Wnt/ β -catenin induit la calcification et constitue une nouvelle cible thérapeutique. En effet, comme l'a démontré Khosla en utilisant un inhibiteur de structure similaire¹⁵⁴, la liaison du 052 à la TG2 induit un changement conformationnel qui l'empêcherait de se lier à LRP5/6. Ceci explique pourquoi nous avons observé une diminution de la liaison de TG2 à LRP5/6, ainsi qu'une prévention de la calcification, en présence du 052 (Résultats, partie 2).

Par ailleurs, il existe un lien entre le TGF- β et la TG2. En effet, la TG2 a été impliquée dans le stockage et l'activation du TGF- β en liant le LTBP qui lui est associé à la matrice extracellulaire⁵²⁹. Or, le TGF- β peut également induire la synthèse et l'activation de TG2^{170, 530-532}. Dans nos expériences, il semble que ce second scénario soit celui qui prédomine. D'abord, l'activité de la TG2 est accrue après celle du TGF- β . Ensuite, un inhibiteur du TGF- β prévient l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -catenin induite par la liaison de TG2 à LRP5/6 (Résultats, partie 2). Il est possible qu'il y ait une boucle de rétroaction positive entre le TGF- β et la TG2. Cependant, nous n'avons pas mesuré un second pic d'activation du TGF- β après celui détecté à une semaine de traitement (Résultats, partie 1). Il pourrait donc se situer au-delà des quatre semaines de traitement où nous avons mesuré la liaison de Smad2/3 à Smad4. Néanmoins, les résultats proposés dans cette thèse font du TGF- β et de la TG2 des cibles attrayantes pour le traitement de l'hypertension systolique isolée.

B. Cibles au niveau de la dégradation de la matrice extracellulaire

La dégradation de la matrice extracellulaire contribue également au développement de plusieurs pathologies humaines. Les MMPs, ADAMTs et les cystéines protéases sont particulièrement impliquées dans ces pathologies⁵⁰². Durant ma formation, nous avons identifié les métalloprotéinases comme des acteurs importants dans le processus de calcification associé au développement de la rigidité artérielle et de l'hypertension systolique isolée. En effet, nous avons observé une augmentation aiguë et transitoire de l'activité de MMP-9 dans ce processus pathologique (Résultats, partie 1). L'inhibition des métalloprotéinases avec la doxycycline a permis de prévenir l'augmentation de la calcification et la rigidité artérielle. De plus, l'activation de MMP-9 précédait celle du TGF- β , suggérant la libération de ce facteur pro-calcifiant et pro-fibrotique sous l'influence de MMP-9. Les enzymes protéolytiques, particulièrement les MMPs, ont fait l'objet de plusieurs projets de développement de médicaments. Cependant, à l'exception du Periostat (doxycycline hyclate), un inhibiteur non spécifique des MMPs approuvé pour les maladies périodontiques, le développement clinique de tous les inhibiteurs des MMPs a été arrêté. Ceci est attribuable à la faible sélectivité des inhibiteurs des MMPs, une mauvaise validation des cibles pour la thérapie visée ainsi qu'à des modèles animaux pré-cliniques mal définis pour la sécurité et l'efficacité⁵³³. De plus, l'importance d'un groupement liant le zinc a été surrévaluée. La conception actuelle des inhibiteurs de MMPs met plutôt l'accent sur le ciblage de sous-domaines, au niveau du site catalytique, de même que l'étude de la flexibilité conformationnelle, afin d'acquérir une bonne sélectivité⁵³⁴. Par ailleurs, les inhibiteurs des MMPs ont plus souvent qu'autrement été utilisés dans un contexte de maladies chroniques, entre autre au niveau cardiovasculaire. La plupart des effets secondaires des inhibiteurs de MMPs ont également lieu durant un traitement à long terme⁵³⁴. Or, il a récemment été découvert que l'activité des MMPs pouvait être régulée dans un contexte aigu, soit par un stress oxydant ou une phosphorylation^{535, 536}. En effet, un stress oxydant induit l'activation des MMPs tandis qu'une phosphorylation induit son inactivation. Ainsi, l'utilisation aiguë de nouveaux inhibiteurs spécifiques des MMPs

pourraient avoir du succès dans des études cliniques pour le traitement de maladies cardiovasculaires aiguës comme l'infarctus du myocarde^{537, 538}.

Dans notre étude sur les MMPs, nous avons observé l'activation aiguë et transitoire de MMP-9. L'utilisation aiguë d'un inhibiteur spécifique de MMP-9 pourrait s'avérer efficace dans notre modèle d'hypertension systolique isolée. En effet, deux semaines de traitement ont suffi pour inhiber la calcification et la fragmentation de l'élastine, mais pas la rigidité artérielle, suggérant l'apport de la fibrose au phénomène (Résultats, partie 1). Il se peut donc que les MMPs soient uniquement impliquées dans la calcification. Cependant, il est également possible que deux semaines d'inhibition non spécifique des MMPs soient suffisantes pour entraîner un déséquilibre au niveau de la matrice favorisant sa synthèse et donc, la fibrose. Un traitement plus aigu permettrait de vérifier laquelle de ces hypothèses est la plus plausible. Cependant, bien que ce concept soit intéressant sur le plan théorique et expérimental, il est difficile d'imaginer comment il pourrait être transposé à des patients en clinique. En effet, vu la précocité de l'augmentation d'activité de MMP-9, il serait difficilement envisageable d'entamer un traitement avant l'apparition des symptômes, à moins que cette activité devienne un biomarqueur de la pathologie. L'inhibition de MMP-9 pourrait toutefois s'avérer bénéfique pour réduire les conséquences de co-morbidités associées à l'hypertension systolique isolée, telles que l'ischémie cardiaque et l'infarctus du myocarde, en atténuant les lésions d'ischémie-reperfusion⁵³⁹ ou la taille de l'infarctus⁵³⁸.

Par ailleurs, la source de l'activation de MMP-9 dans notre étude demeure inconnue. Bien que nous ayons obtenu des résultats négatifs lors de la mesure du stress oxydant dans ce modèle⁵⁴⁰, nous n'avons pas effectué cette mesure en aigu, soit avant le 7^e jour de traitement in vivo. Il se pourrait donc qu'un stress oxydant aigu et transitoire ait déclenché l'activation de MMP-9. Une autre alternative pourrait impliquer une déphosphorylation de la MMP-9 par l'alkaline phosphatase. En effet, cette enzyme, qui contribue à la formation des cristaux d'hydroxyapatite, est exprimée dans notre modèle de calcification⁵⁴¹. Il a, de plus, été démontré que les CMLVs exprimaient spontanément cette enzyme, très tôt dans le processus de calcification, tant intinale que médiale⁵⁴². Or, une

déphosphorylation de la MMP-2 par l'alcaline phosphatase augmente de 25 fois son activité⁵³⁶. Ainsi, le profil d'expression et d'activité de la phosphatase alcaline et la phosphorylation de MMP-9 pourraient en révéler davantage sur la source de l'activation de cette dernière dans notre modèle.

C. Conclusion

En conclusion, la matrice extracellulaire est une cible thérapeutique actuellement en évaluation dans plusieurs pathologies. Dans le cas du vieillissement vasculaire, on observe une augmentation de la rigidité des artères de gros calibre. Les modifications de la matrice extracellulaire telles que la fragmentation du réseau élastique, la calcification des lamelles élastiques et la fibrose sont les principaux responsables de ce phénomène. La rigidité accrue de ces artères entraîne l'augmentation de la pression systolique et la diminution de la pression diastolique, ce qui mène au développement de l'hypertension systolique isolée. Cette pathologie entraîne un dommage des organes cibles et accroît le risque de morbidité et de mortalité⁴¹⁰. Par ailleurs, même si le traitement de l'hypertension systolique isolée par une modification du style de vie et la combinaison de médicaments antihypertenseurs permet de réduire la mortalité et le nombre d'événements cardiovasculaires, le contrôle de la pression demeure décevant⁵⁴³. Or, il a été démontré que, malgré des effets similaires sur la pression artérielle brachiale, certains médicaments agissent différemment sur la pression aortique centrale⁵⁴⁴. Ce phénomène peut, en partie, expliquer les effets interprétés comme étant « pression indépendants » de certains traitements anti-hypertenseurs. Ainsi, d'une part, la mesure de la pression centrale pourrait se révéler un outil intéressant en clinique. D'autre part, cibler directement les mécanismes impliqués dans le développement de la rigidité artérielle pourrait mener au développement de futurs traitements pharmacologiques efficaces.

Dans ce même ordre d'idée, mes travaux de doctorat ont permis d'établir la séquence des événements qui se succèdent au niveau de la matrice extracellulaire pendant

le développement de l'hypertension systolique isolée. Ainsi, trois éléments clés ont été identifiés, soient les MMPs, particulièrement MMP-9, le TGF- β et la transglutaminase 2. Ces derniers sont également impliqués dans d'autres pathologies qui découlent de modifications de la matrice extracellulaire. En outre, de nouvelles thérapies présentement en développement ciblent directement les MMPs, le TGF- β et la transglutaminase 2 et ont montré des effets bénéfiques dans ces pathologies. Leur ciblage, dans le contexte de l'hypertension systolique isolée, pourraient également être avantageux, en s'attaquant directement à la source du problème.

Bibliographie

1. Young B, Heath JW, Burkitt HG. *Wheater's Functional histology : a text and colour atlas*. Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone; 2000.
2. Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today*. 1995;16:449-457.
3. Miyasaka M, Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:360-370.
4. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*. 2000;440:653-666.
5. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34:1508-1512.
6. Fitridge R, Thompson MM. *Mechanisms of vascular disease : a textbook for vascular surgeons*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press; 2007.
7. Aird W. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med*. 2004;32:S271-279.
8. Aird WC. *Endothelial biomedicine*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press; 2007.
9. Lehle K, Straub RH, Morawietz H, Kunz-Schughart LA. Relevance of disease- and organ-specific endothelial cells for in vitro research. *Cell Biol Int*;34:1231-1238.
10. Eble JA, Niland S. The extracellular matrix of blood vessels. *Curr Pharm Des*. 2009;15:1385-1400.
11. Thyberg J, Blomgren K, Roy J, Tran PK, Hedin U. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem*. 1997;45:837-846.
12. Haga JH, Li YS, Chien S. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *J Biomech*. 2007;40:947-960.
13. Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev Biol*. 2001;230:278-301.
14. Cook CL, Weiser MC, Schwartz PE, Jones CL, Majack RA. Developmentally timed expression of an embryonic growth phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74:189-196.

15. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995;75:487-517.
16. Bou-Gharios G, Ponticos M, Rajkumar V, Abraham D. Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell Prolif.* 2004;37:207-220.
17. Wynne BM, Chiao CW, Webb RC. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens.* 2009;3:84-95.
18. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* 1996;76:967-1003.
19. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003;27:201-206.
20. Mohanty MJ, Li X. Stretch-induced Ca(2+) release via an IP(3)-insensitive Ca(2+) channel. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;283:C456-462.
21. Zafar S, Hussain A, Liu Y, Lewis D, Inesi G. Specificity of ligand binding to transport sites: Ca²⁺ binding to the Ca²⁺ transport ATPase and its dependence on H⁺ and Mg²⁺. *Arch Biochem Biophys.* 2008;476:87-94.
22. Wu KD, Bungard D, Lytton J. Regulation of SERCA Ca²⁺ pump expression by cytoplasmic Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C843-851.
23. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:12877-12882.
24. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:349-363.
25. van Beurden HE, Von den Hoff JW, Torensma R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair. *J Dent Res.* 2005;84:871-880.
26. Huxley-Jones J, Foord SM, Barnes MR. Drug discovery in the extracellular matrix. *Drug Discov Today.* 2008;13:685-694.
27. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother.* 2003;57:195-202.

28. Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC, Rifkin DB. Fibrillin microfibrils: multipurpose extracellular networks in organismal physiology. *Physiol Genomics*. 2004;19:151-154.
29. Brodsky B, Ramshaw JA. The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol*. 1997;15:545-554.
30. Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. Collagen structure and functional implications. *Micron*. 2001;32:251-260.
31. Kavitha O, Thampan RV. Factors influencing collagen biosynthesis. *J Cell Biochem*. 2008;104:1150-1160.
32. Church RL, Pfeiffer SE, Tanzer ML. Collagen biosynthesis: synthesis and secretion of a high molecular weight collagen precursor (procollagen). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68:2638-2642.
33. Plenz GA, Deng MC, Robenek H, Volker W. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2003;166:1-11.
34. <http://219.221.200.61/ywwy/zbsw%28E%29/edetail4.htm>.
35. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:403-434.
36. Shi Y, O'Brien JE, Jr., Ala-Kokko L, Chung W, Mannion JD, Zalewski A. Origin of extracellular matrix synthesis during coronary repair. *Circulation*. 1997;95:997-1006.
37. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55:1531-1546.
38. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci*. 2005;118:1341-1353.
39. Ferreira LR, Norris K, Smith T, Hebert C, Sauk JJ. Hsp47 and other ER-resident molecular chaperones form heterocomplexes with each other and with collagen type IV chains. *Connect Tissue Res*. 1996;33:265-273.
40. Chessler SD, Byers PH. BiP binds type I procollagen pro alpha chains with mutations in the carboxyl-terminal propeptide synthesized by cells from patients with osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem*. 1993;268:18226-18233.
41. Ferreira LR, Norris K, Smith T, Hebert C, Sauk JJ. Association of Hsp47, Grp78, and Grp94 with procollagen supports the successive or coupled action of molecular chaperones. *J Cell Biochem*. 1994;56:518-526.

42. Martinek N, Shahab J, Sodek J, Ringuette M. Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? *J Dent Res.* 2007;86:296-305.
43. Leung MK, Fessler LI, Greenberg DB, Fessler JH. Separate amino and carboxyl procollagen peptidases in chick embryo tendon. *J Biol Chem.* 1979;254:224-232.
44. Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S. Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1. *J Biol Chem.* 2002;277:37377-37381.
45. Eyre DR, Paz MA, Gallop PM. Cross-linking in collagen and elastin. *Annu Rev Biochem.* 1984;53:717-748.
46. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991;5:2814-2823.
47. Nishiyama T, McDonough AM, Bruns RR, Burgeson RE. Type XII and XIV collagens mediate interactions between banded collagen fibers in vitro and may modulate extracellular matrix deformability. *J Biol Chem.* 1994;269:28193-28199.
48. Burgeson RE, Lunstrum GP, Rokosova B, Rimberg CS, Rosenbaum LM, Keene DR. The structure and function of type VII collagen. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;580:32-43.
49. Snellman A, Keranen MR, Hagg PO, Lamberg A, Hiltunen JK, Kivirikko KI, Pihlajaniemi T. Type XIII collagen forms homotrimers with three triple helical collagenous domains and its association into disulfide-bonded trimers is enhanced by prolyl 4-hydroxylase. *J Biol Chem.* 2000;275:8936-8944.
50. Balleisen L, Rauterberg J. Platelet activation by basement membrane collagens. *Thromb Res.* 1980;18:725-732.
51. Morisaki N, Kanzaki T, Tamura K, Saito I, Shiina R, Saito Y. Specific inhibition of vascular cell adhesion molecule-1 expression by type IV collagen in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;214:1163-1167.
52. Dingemans KP, Teeling P, Lagendijk JH, Becker AE. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. *Anat Rec.* 2000;258:1-14.
53. Mayne R, Burgeson RE. *Structure and function of collagen types.* Orlando: Academic Press; 1987.

54. Sibinga NE, Foster LC, Hsieh CM, Perrella MA, Lee WS, Endege WO, Sage EH, Lee ME, Haber E. Collagen VIII is expressed by vascular smooth muscle cells in response to vascular injury. *Circ Res.* 1997;80:532-541.
55. Ford CM, Li S, Pickering JG. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT(1) receptor, transforming growth factor-beta, and tyrosine phosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1843-1851.
56. Grassel S, Tan EM, Timpl R, Chu ML. Collagen type XVI expression is modulated by basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *FEBS Lett.* 1998;436:197-201.
57. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:1223-1230.
58. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci.* 2002;115:2817-2828.
59. Arribas SM, Hinek A, Gonzalez MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther.* 2006;111:771-791.
60. Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31:261-272.
61. Partridge SM, Elsdon DF, Thomas J, Dorfman A, Telser A, Ho PL. Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in elastin. *Biochem J.* 1964;93:30C-33C.
62. Rucker RB, Tinker D. Structure and metabolism of arterial elastin. *Int Rev Exp Pathol.* 1977;17:1-47.
63. Shapiro SD, Endicott SK, Province MA, Pierce JA, Campbell EJ. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest.* 1991;87:1828-1834.
64. Downing AK, Knott V, Werner JM, Cardy CM, Campbell ID, Handford PA. Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell.* 1996;85:597-605.
65. Kielty CM. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med.* 2006;8:1-23.

66. Kelleher CM, McLean SE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and aortic development. *Curr Top Dev Biol.* 2004;62:153-188.
67. Zhang H, Hu W, Ramirez F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J Cell Biol.* 1995;129:1165-1176.
68. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev.* 2009;89:957-989.
69. Pfaff M, Reinhardt DP, Sakai LY, Timpl R. Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1. *FEBS Lett.* 1996;384:247-250.
70. Sakamoto H, Broekelmann T, Cheresh DA, Ramirez F, Rosenbloom J, Mecham RP. Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J Biol Chem.* 1996;271:4916-4922.
71. Charbonneau NL, Ono RN, Corson GM, Keene DR, Sakai LY. Fine tuning of growth factor signals depends on fibrillin microfibril networks. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004;72:37-50.
72. Wagenseil JE, Mecham RP. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2007;81:229-240.
73. Weinbaum JS, Broekelmann TJ, Pierce RA, Werneck CC, Segade F, Craft CS, Knutsen RH, Mecham RP. Deficiency in microfibril-associated glycoprotein-1 leads to complex phenotypes in multiple organ systems. *J Biol Chem.* 2008;283:25533-25543.
74. Lemaire R, Bayle J, Mecham RP, Lafyatis R. Microfibril-associated MAGP-2 stimulates elastic fiber assembly. *J Biol Chem.* 2007;282:800-808.
75. Argraves WS, Greene LM, Cooley MA, Gallagher WM. Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Rep.* 2003;4:1127-1131.
76. Timpl R, Sasaki T, Kostka G, Chu ML. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:479-489.
77. McLaughlin PJ, Chen Q, Horiguchi M, Starcher BC, Stanton JB, Broekelmann TJ, Marmorstein AD, McKay B, Mecham R, Nakamura T, Marmorstein LY. Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol.* 2006;26:1700-1709.
78. Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng CF, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross Jr J, Honjo T,

- Chien KR. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature*. 2002;415:171-175.
79. Kostka G, Giltay R, Bloch W, Addicks K, Timpl R, Fassler R, Chu ML. Perinatal lethality and endothelial cell abnormalities in several vessel compartments of fibulin-1-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2001;21:7025-7034.
80. McLaughlin PJ, Bakall B, Choi J, Liu Z, Sasaki T, Davis EC, Marmorstein AD, Marmorstein LY. Lack of fibulin-3 causes early aging and herniation, but not macular degeneration in mice. *Hum Mol Genet*. 2007;16:3059-3070.
81. Sicot FX, Tsuda T, Markova D, Klement JF, Arita M, Zhang RZ, Pan TC, Mecham RP, Birk DE, Chu ML. Fibulin-2 is dispensable for mouse development and elastic fiber formation. *Mol Cell Biol*. 2008;28:1061-1067.
82. Zanetti M, Braghetta P, Sabatelli P, Mura I, Doliana R, Colombatti A, Volpin D, Bonaldo P, Bressan GM. EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol Cell Biol*. 2004;24:638-650.
83. Zacchigna L, Vecchione C, Notte A, Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Cifelli G, Ferrari A, Maffei A, Fabbro C, Braghetta P, Marino G, Selvetella G, Aretini A, Colonnese C, Bettarini U, Russo G, Soligo S, Adorno M, Bonaldo P, Volpin D, Piccolo S, Lembo G, Bressan GM. Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell*. 2006;124:929-942.
84. Marson A, Rock MJ, Cain SA, Freeman LJ, Morgan A, Mellody K, Shuttleworth CA, Baldock C, Kielty CM. Homotypic fibrillin-1 interactions in microfibril assembly. *J Biol Chem*. 2005;280:5013-5021.
85. Qian RQ, Glanville RW. Alignment of fibrillin molecules in elastic microfibrils is defined by transglutaminase-derived cross-links. *Biochemistry*. 1997;36:15841-15847.
86. Hinek A, Rabinovitch M. 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol*. 1994;126:563-574.
87. Derbali H, Bosse Y, Cote N, Pibarot P, Audet A, Pepin A, Arseneault B, Couture C, Despres JP, Mathieu P. Increased biglycan in aortic valve stenosis leads to the overexpression of phospholipid transfer protein via Toll-like receptor 2. *Am J Pathol*;176:2638-2645.
88. Gustafsson M, Boren J. Mechanism of lipoprotein retention by the extracellular matrix. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15:505-514.

89. Tannock LR, King VL. Proteoglycan mediated lipoprotein retention: a mechanism of diabetic atherosclerosis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008;9:289-300.
90. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:551-561.
91. Reynertson RH, Roden L. Proteoglycans and hypertension. II. [35S]sulfate incorporation into aorta proteoglycans of spontaneously hypertensive rats. *Coll Relat Res.* 1986;6:103-120.
92. Reynertson RH, Oparil S, Roden L. Proteoglycans and hypertension: III: Aorta proteoglycans in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Am J Med Sci.* 1987;293:171-176.
93. Walker-Caprioglio HM, Koob TJ, McGuffee LJ. Proteoglycan synthesis in normotensive and spontaneously hypertensive rat arteries in vitro. *Matrix.* 1992;12:308-320.
94. Wight TN. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14:617-623.
95. Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res.* 2004;94:1158-1167.
96. Arciniegas E, Neves CY, Candelle D, Parada D. Differential versican isoforms and aggrecan expression in the chicken embryo aorta. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;279:592-600.
97. O'Brien KD, Olin KL, Alpers CE, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Wight TN, Chait A. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation.* 1998;98:519-527.
98. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Gotte M, Malle E, Schaefer RM, Grone HJ. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest.* 2005;115:2223-2233.
99. Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem.* 1999;274:18843-18846.
100. Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res.* 2005;96:488-500.

101. Tkachenko E, Effenbein A, Tirziu D, Simons M. Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner. *Circ Res.* 2006;98:1398-1404.
102. Knox S, Merry C, Stringer S, Melrose J, Whitelock J. Not all perlecan are created equal: interactions with fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF receptors. *J Biol Chem.* 2002;277:14657-14665.
103. Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci.* 2003;116:3269-3276.
104. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002;115:3861-3863.
105. Verderio EA, Johnson T, Griffin M. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. *Amino Acids.* 2004;26:387-404.
106. Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol.* 2005;24:389-399.
107. Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 2000;218:213-234.
108. Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol.* 2004;22:521-538.
109. Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2002;12:197-207.
110. Sorokin LM, Pausch F, Frieser M, Kroger S, Ohage E, Deutzmann R. Developmental regulation of the laminin alpha5 chain suggests a role in epithelial and endothelial cell maturation. *Dev Biol.* 1997;189:285-300.
111. Chung AE, Durkin ME. Entactin: structure and function. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990;3:275-282.
112. Bornstein P, Sage EH. Thrombospondins. *Methods Enzymol.* 1994;245:62-85.
113. Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol.* 1995;130:503-506.
114. Sage EH, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem.* 1991;266:14831-14834.

115. Murphy-Ullrich JE, Hook M. Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. *J Cell Biol.* 1989;109:1309-1319.
116. DiPietro LA, Nissen NN, Gamelli RL, Koch AE, Pyle JM, Polverini PJ. Thrombospondin 1 synthesis and function in wound repair. *Am J Pathol.* 1996;148:1851-1860.
117. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11:59-69.
118. Zhou L, Isenberg JS, Cao Z, Roberts DD. Type I collagen is a molecular target for inhibition of angiogenesis by endogenous thrombospondin-1. *Oncogene.* 2006;25:536-545.
119. Dixit VM, Haverstick DM, O'Rourke KM, Hennessy SW, Grant GA, Santoro SA, Frazier WA. A monoclonal antibody against human thrombospondin inhibits platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:3472-3476.
120. Wrana JL, Maeno M, Hawrylyshyn B, Yao KL, Domenicucci C, Sodek J. Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J Cell Biol.* 1988;106:915-924.
121. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981;26:99-105.
122. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation.* 1999;100:2168-2176.
123. Pieces of eight: bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis. *Trends Cell Biol.* 1997;7:182-186.
124. Charest A, Pepin A, Shetty R, Cote C, Voisine P, Dagenais F, Pibarot P, Mathieu P. Distribution of SPARC during neovascularisation of degenerative aortic stenosis. *Heart.* 2006;92:1844-1849.
125. Lane TF, Iruela-Arispe ML, Johnson RS, Sage EH. SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *J Cell Biol.* 1994;125:929-943.
126. Chiquet-Ehrismann R. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:986-990.

127. Midwood KS, Schwarzbauer JE. Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho-mediated signaling pathways. *Mol Biol Cell*. 2002;13:3601-3613.
128. Dufourcq P, Louis H, Moreau C, Daret D, Boisseau MR, Lamaziere JM, Bonnet J. Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atheromatous plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:168-176.
129. Preissner KT. Structure and biological role of vitronectin. *Annu Rev Cell Biol*. 1991;7:275-310.
130. McCartney-Francis NL, Frazier-Jessen M, Wahl SM. TGF-beta: a balancing act. *Int Rev Immunol*. 1998;16:553-580.
131. Ghosh J, Murphy MO, Turner N, Khwaja N, Halka A, Kielty CM, Walker MG. The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:28-36.
132. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004;18:816-827.
133. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997;390:465-471.
134. Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Vascular cell apoptosis: cell type-specific modulation by transforming growth factor-beta1 in endothelial cells versus smooth muscle cells. *Circulation*. 1999;99:2019-2026.
135. Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 1997;389:631-635.
136. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol*. 1999;181:153-159.
137. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*. 2009;19:128-139.
138. Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;70:1-32.

139. Trackman PC, Bedell-Hogan D, Tang J, Kagan HM. Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J Biol Chem.* 1992;267:8666-8671.
140. Uzel MI, Scott IC, Babakhanlou-Chase H, Palamakumbura AH, Pappano WN, Hong HH, Greenspan DS, Trackman PC. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem.* 2001;276:22537-22543.
141. Gacheru SN, Trackman PC, Shah MA, O'Gara CY, Spacciapoli P, Greenaway FT, Kagan HM. Structural and catalytic properties of copper in lysyl oxidase. *J Biol Chem.* 1990;265:19022-19027.
142. Wang SX, Mure M, Medzihradzky KF, Burlingame AL, Brown DE, Dooley DM, Smith AJ, Kagan HM, Klinman JP. A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains. *Science.* 1996;273:1078-1084.
143. Dove JE, Klinman JP. Trihydroxyphenylalanine quinone (TPQ) from copper amine oxidases and lysyl tyrosylquinone (LTQ) from lysyl oxidase. *Adv Protein Chem.* 2001;58:141-174.
144. Williamson PR, Kagan HM. Reaction pathway of bovine aortic lysyl oxidase. *J Biol Chem.* 1986;261:9477-9482.
145. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:2304-2316.
146. Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol.* 1998;16:387-398.
147. Pisano JJ, Finlayson JS, Peyton MP. [Cross-link in fibrin polymerized by factor 13: epsilon-(gamma-glutamyl)lysine.]. *Science.* 1968;160:892-893.
148. Siegel M, Khosla C. Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. *Pharmacol Ther.* 2007;115:232-245.
149. Collighan RJ, Griffin M. Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications. *Amino Acids.* 2009;36:659-670.
150. Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J.* 2002;368:377-396.

151. Bergamini CM. GTP modulates calcium binding and cation-induced conformational changes in erythrocyte transglutaminase. *FEBS Lett.* 1988;239:255-258.
152. Pardin C, Gillet SM, Keillor JW. Synthesis and evaluation of peptidic irreversible inhibitors of tissue transglutaminase. *Bioorg Med Chem.* 2006;14:8379-8385.
153. Bakker EN, Buus CL, VanBavel E, Mulvany MJ. Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. *J Vasc Res.* 2004;41:174-182.
154. Pinkas DM, Strop P, Brunger AT, Khosla C. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLoS Biol.* 2007;5:e327.
155. Thomazy V, Fesus L. Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 1989;255:215-224.
156. Kaetsu H, Hashiguchi T, Foster D, Ichinose A. Expression and release of the a and b subunits for human coagulation factor XIII in baby hamster kidney (BHK) cells. *J Biochem.* 1996;119:961-969.
157. Balklava Z, Verderio E, Collighan R, Gross S, Adams J, Griffin M. Analysis of tissue transglutaminase function in the migration of Swiss 3T3 fibroblasts: the active-state conformation of the enzyme does not affect cell motility but is important for its secretion. *J Biol Chem.* 2002;277:16567-16575.
158. Gaudry CA, Verderio E, Aeschlimann D, Cox A, Smith C, Griffin M. Cell surface localization of tissue transglutaminase is dependent on a fibronectin-binding site in its N-terminal beta-sandwich domain. *J Biol Chem.* 1999;274:30707-30714.
159. Nurminskaya M, Kaartinen MT. Transglutaminases in mineralized tissues. *Front Biosci.* 2006;11:1591-1606.
160. Akimov SS, Belkin AM. Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood.* 2001;98:1567-1576.
161. Akimov SS, Belkin AM. Cell-surface transglutaminase promotes fibronectin assembly via interaction with the gelatin-binding domain of fibronectin: a role in TGFbeta-dependent matrix deposition. *J Cell Sci.* 2001;114:2989-3000.

162. Bakker EN, Buus CL, Spaan JA, Perree J, Ganga A, Rolf TM, Sorop O, Bramsen LH, Mulvany MJ, Vanbavel E. Small artery remodeling depends on tissue-type transglutaminase. *Circ Res*. 2005;96:119-126.
163. Janiak A, Zemskov EA, Belkin AM. Cell surface transglutaminase promotes RhoA activation via integrin clustering and suppression of the Src-p190RhoGAP signaling pathway. *Mol Biol Cell*. 2006;17:1606-1619.
164. Akimov SS, Krylov D, Fleischman LF, Belkin AM. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *J Cell Biol*. 2000;148:825-838.
165. Bergamini CM, Griffin M, Pansini FS. Transglutaminase and vascular biology: physiopathologic implications and perspectives for therapeutic interventions. *Curr Med Chem*. 2005;12:2357-2372.
166. Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:140-156.
167. Hasegawa G, Suwa M, Ichikawa Y, Ohtsuka T, Kumagai S, Kikuchi M, Sato Y, Saito Y. A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase. *Biochem J*. 2003;373:793-803.
168. Mishra S, Murphy LJ. Tissue transglutaminase has intrinsic kinase activity: identification of transglutaminase 2 as an insulin-like growth factor-binding protein-3 kinase. *J Biol Chem*. 2004;279:23863-23868.
169. Verderio E, Nicholas B, Gross S, Griffin M. Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death. *Exp Cell Res*. 1998;239:119-138.
170. George MD, Vollberg TM, Floyd EE, Stein JP, Jetten AM. Regulation of transglutaminase type II by transforming growth factor-beta 1 in normal and transformed human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*. 1990;265:11098-11104.
171. Fujimoto M, Kanzaki H, Nakayama H, Higuchi T, Hatayama H, Iwai M, Kaneko Y, Mori T, Fujita J. Requirement for transglutaminase in progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology*. 1996;137:1096-1101.
172. Ishii I, Ui M. Possible involvement of GTP-binding proteins in 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induction of tissue transglutaminase in mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;203:1773-1780.

173. Kuncio GS, Tsyganskaya M, Zhu J, Liu SL, Nagy L, Thomazy V, Davies PJ, Zern MA. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. *Am J Physiol.* 1998;274:G240-245.
174. Ou H, Haendeler J, Aebly MR, Kelly LA, Cholewa BC, Koike G, Kwitek-Black A, Jacob HJ, Berk BC, Miano JM. Retinoic acid-induced tissue transglutaminase and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2000;87:881-887.
175. Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem.* 2001;276:18415-18422.
176. Zemskov EA, Mikhailenko I, Strickland DK, Belkin AM. Cell-surface transglutaminase undergoes internalization and lysosomal degradation: an essential role for LRP1. *J Cell Sci.* 2007;120:3188-3199.
177. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev.* 2002;102:4501-4524.
178. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res;*38:D227-233.
179. Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, Schwartz RS. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1119-1127.
180. Overall CM, Blobel CP. In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:245-257.
181. Moss G. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. London; 2010.
182. Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Ruth FX, McKay DB, Bode W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 1995;4:823-840.
183. Matthews B. Structural Basis of the Action of Thermolysin and Related Zinc Peptidases. *Accounts of Chemistry Research.* 1988;21.
184. Hooper NM. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 1994;354:1-6.

185. Bode W, Gomis-Ruth FX, Huber R, Zwilling R, Stocker W. Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases. *Nature*. 1992;358:164-167.
186. Jiang W, Gorbea CM, Flannery AV, Beynon RJ, Grant GA, Bond JS. The alpha subunit of meprin A. Molecular cloning and sequencing, differential expression in inbred mouse strains, and evidence for divergent evolution of the alpha and beta subunits. *J Biol Chem*. 1992;267:9185-9193.
187. Stocker W, Gomis-Ruth FX, Bode W, Zwilling R. Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *Eur J Biochem*. 1993;214:215-231.
188. Stocker W, Zwilling R. Astacin. *Methods Enzymol*. 1995;248:305-325.
189. Bond JS, Beynon RJ. The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci*. 1995;4:1247-1261.
190. Ge G, Greenspan DS. Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2006;78:47-68.
191. Gomis-Ruth FX. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol*. 2003;24:157-202.
192. Jones JI, Prevette T, Gockerman A, Clemmons DR. Ligand occupancy of the alpha-V-beta3 integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2482-2487.
193. Renier G, Clement I, Desfaits AC, Lambert A. Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on monocyte and macrophage tumor necrosis factor-alpha production. *Endocrinology*. 1996;137:4611-4618.
194. Nichols TC, du Laney T, Zheng B, Bellinger DA, Nickols GA, Engleman W, Clemmons DR. Reduction in atherosclerotic lesion size in pigs by alphaVbeta3 inhibitors is associated with inhibition of insulin-like growth factor-I-mediated signaling. *Circ Res*. 1999;85:1040-1045.
195. Florini JR, Ewton DZ. Induction of gene expression in muscle by the IGFs. *Growth Regul*. 1992;2:23-29.
196. Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, Liao Y, Ishikura F, Yoshinaka T, Ohmoto H, Node K, Yoshino K, Ishiguro H, Asanuma H, Sanada S, Matsumura Y, Takeda H, Beppu S, Tada M, Hori M, Higashiyama S. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med*. 2002;8:35-40.

197. Kataoka H. EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *J Dermatol Sci.* 2009;56:148-153.
198. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature.* 1999;402:884-888.
199. Barrick CJ, Roberts RB, Rojas M, Rajamannan NM, Suitt CB, O'Brien KD, Smyth SS, Threadgill DW. Reduced EGFR causes abnormal valvular differentiation leading to calcific aortic stenosis and left ventricular hypertrophy in C57BL/6J but not 129S1/SvImJ mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:H65-75.
200. van Goor H, Melenhorst WB, Turner AJ, Holgate ST. Adamalysins in biology and disease. *J Pathol.* 2009;219:277-286.
201. Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:160-169.
202. Chase AJ, Newby AC. Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling. *J Vasc Res.* 2003;40:329-343.
203. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92:827-839.
204. Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol.* 2002;22:51-86.
205. Owen CA, Hu Z, Lopez-Otin C, Shapiro SD. Membrane-bound matrix metalloproteinase-8 on activated polymorphonuclear cells is a potent, tissue inhibitor of metalloproteinase-resistant collagenase and serpinase. *J Immunol.* 2004;172:7791-7803.
206. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* 1995;270:5872-5876.
207. Amalinei C, Caruntu ID, Balan RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol.* 2007;48:323-334.

208. **Ii M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231:20-27.**
209. **Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez-Otin C. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Curr Top Dev Biol*. 2003;54:1-74.**
210. **Shiomi T, Okada Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev*. 2003;22:145-152.**
211. **Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2001;86:324-333.**
212. **Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 2002;90:251-262.**
213. **Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M, Docherty AJ. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry*. 1991;30:8097-8102.**
214. **Di Cera E. Serine proteases. *IUBMB Life*. 2009;61:510-515.**
215. **Blow DM, Birktoft JJ, Hartley BS. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature*. 1969;221:337-340.**
216. **Bonnefoy A, Legrand C. Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase. *Thromb Res*. 2000;98:323-332.**
217. **Lijnen HR, Lupu F, Moons L, Carmeliet P, Goulding D, Collen D. Temporal and topographic matrix metalloproteinase expression after vascular injury in mice. *Thromb Haemost*. 1999;81:799-807.**
218. **Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:63-88.**
219. **Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477:98-111.**
220. **Lutgens SP, Cleutjens KB, Daemen MJ, Heeneman S. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J*. 2007;21:3029-3041.**
221. **Sukhova GK, Zhang Y, Pan JH, Wada Y, Yamamoto T, Naito M, Kodama T, Tsimikas S, Witztum JL, Lu ML, Sakara Y, Chin MT, Libby P, Shi GP. Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 2003;111:897-906.**

222. Bromme D, Okamoto K, Wang BB, Biroc S. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem*. 1996;271:2126-2132.
223. Yasuda Y, Li Z, Greenbaum D, Bogyo M, Weber E, Bromme D. Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *J Biol Chem*. 2004;279:36761-36770.
224. Lemarie CA, Tharaux PL, Lehoux S. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol*;48:433-439.
225. Maquart FX, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse JC. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49:199-202.
226. Robert L, Tixier JM, Berenholz S, Levy O, Hornebeck W. [Inhibition of elastase activity in human gingival extracts by elastin peptides]. *Pathol Biol (Paris)*. 1992;40:879-882.
227. Xie DL, Hui F, Meyers R, Homandberg GA. Cartilage chondrolysis by fibronectin fragments is associated with release of several proteinases: stromelysin plays a major role in chondrolysis. *Arch Biochem Biophys*. 1994;311:205-212.
228. Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 1999;274:13586-13593.
229. Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med*. 2007;11:176-205.
230. Martinez-Lemus LA, Wu X, Wilson E, Hill MA, Davis GE, Davis MJ, Meininger GA. Integrins as unique receptors for vascular control. *J Vasc Res*. 2003;40:211-233.
231. Takagi J, Springer TA. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev*. 2002;186:141-163.
232. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Gronholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790:431-444.
233. Baker EL, Zaman MH. The biomechanical integrin. *J Biomech*;43:38-44.

234. Huang C, Ogawa R. Mechanotransduction in bone repair and regeneration. *FASEB J*.
235. Mousa SA. Adhesion molecules: potential therapeutic and diagnostic implications. *Methods Mol Biol*;663:261-276.
236. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110:673-687.
237. Vogel WF, Abdulhussein R, Ford CE. Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cell Signal*. 2006;18:1108-1116.
238. Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell*. 1997;1:13-23.
239. Abdulhussein R, McFadden C, Fuentes-Prior P, Vogel WF. Exploring the collagen-binding site of the DDR1 tyrosine kinase receptor. *J Biol Chem*. 2004;279:31462-31470.
240. Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G, Yancopoulos GD. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell*. 1997;1:25-34.
241. Vogel WF. Ligand-induced shedding of discoidin domain receptor 1. *FEBS Lett*. 2002;514:175-180.
242. Hou G, Vogel W, Bendeck MP. The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *J Clin Invest*. 2001;107:727-735.
243. Hou G, Vogel WF, Bendeck MP. Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression. *Circ Res*. 2002;90:1147-1149.
244. Partridge SM, Davis HF, Adair GS. The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin. *Biochem J*. 1955;61:11-21.
245. Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B, Debelle L. Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49:235-244.
246. Hornebeck W, Tixier JM, Robert L. Inducible adhesion of mesenchymal cells to elastic fibers: elastonectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:5517-5520.
247. Rodgers UR, Weiss AS. Cellular interactions with elastin. *Pathol Biol (Paris)*. 2005;53:390-398.

248. Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res.* 2001;52:372-386.
249. Colognato H, Winkelmann DA, Yurchenco PD. Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol.* 1999;145:619-631.
250. Henry MD, Campbell KP. A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell.* 1998;95:859-870.
251. Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. *Adv Protein Chem.* 2005;70:437-461.
252. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system. An overview of structure and function. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;44:333-340.
253. Wolinsky H, Glagov S. Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ Res.* 1967;20:409-421.
254. Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:134-145.
255. Torsney E, Hu Y, Xu Q. Adventitial progenitor cells contribute to arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15:64-68.
256. Shadwick RE. Mechanical design in arteries. *J Exp Biol.* 1999;202:3305-3313.
257. Dobrin PB. Mechanical properties of arteries. *Physiol Rev.* 1978;58:397-460.
258. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology.* Philadelphia: Saunders; 2000.
259. Levick JR. *An introduction to cardiovascular physiology.* London
New York: Arnold ;
Distributed in the United States of America by Oxford University Press; 2003.
260. Greenwald SE, Moore JE, Jr., Rachev A, Kane TP, Meister JJ. Experimental investigation of the distribution of residual strains in the artery wall. *J Biomech Eng.* 1997;119:438-444.
261. Roach MR, Burton AC. The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. *Can J Biochem Physiol.* 1957;35:681-690.
262. Clark E. Studies on the growth of blood-vessels in the tail of the frog larva by observation and experiment on the living animal. *Am J Anat.* 1918;23:37-88.

263. Lu X, Zhao JB, Wang GR, Gregersen H, Kassab GS. Remodeling of the zero-stress state of femoral arteries in response to flow overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1547-1559.
264. Jackson ZS, Dajnowiec D, Gotlieb AI, Langille BL. Partial off-loading of longitudinal tension induces arterial tortuosity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:957-962.
265. Jackson ZS, Gotlieb AI, Langille BL. Wall tissue remodeling regulates longitudinal tension in arteries. *Circ Res*. 2002;90:918-925.
266. Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ, Schafer AI. Physiological cyclic stretch directs L-arginine transport and metabolism to collagen synthesis in vascular smooth muscle. *FASEB J*. 2000;14:1775-1783.
267. Lee RT, Yamamoto C, Feng Y, Potter-Perigo S, Briggs WH, Landschulz KT, Turi TG, Thompson JF, Libby P, Wight TN. Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2001;276:13847-13851.
268. Sutcliffe MC, Davidson JM. Effect of static stretching on elastin production by porcine aortic smooth muscle cells. *Matrix*. 1990;10:148-153.
269. Chen Q, Li W, Quan Z, Sumpio BE. Modulation of vascular smooth muscle cell alignment by cyclic strain is dependent on reactive oxygen species and P38 mitogen-activated protein kinase. *J Vasc Surg*. 2003;37:660-668.
270. Katsumi A, Milanini J, Kiosses WB, del Pozo MA, Kaunas R, Chien S, Hahn KM, Schwartz MA. Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *J Cell Biol*. 2002;158:153-164.
271. Mills I, Cohen CR, Kamal K, Li G, Shin T, Du W, Sumpio BE. Strain activation of bovine aortic smooth muscle cell proliferation and alignment: study of strain dependency and the role of protein kinase A and C signaling pathways. *J Cell Physiol*. 1997;170:228-234.
272. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003;42:1206-1252.
273. Hemmelgarn BR, McAllister FA, Myers MG, McKay DW, Bolli P, Abbott C, Schiffrin EL, Grover S, Honos G, Lebel M, Mann K, Wilson T, Penner B, Tremblay G, Tobe SW, Feldman RD. The 2005 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension:

- part 1- blood pressure measurement, diagnosis and assessment of risk. *Can J Cardiol.* 2005;21:645-656.
274. Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol*;5:173-192.
275. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension.* 2001;38:581-587.
276. Sonoyama K, Greenstein A, Price A, Khavandi K, Heagerty T. Vascular remodeling: implications for small artery function and target organ damage. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2007;1:129-137.
277. Bakker EN, Pistea A, Spaan JA, Rolf T, de Vries CJ, van Rooijen N, Candi E, VanBavel E. Flow-dependent remodeling of small arteries in mice deficient for tissue-type transglutaminase: possible compensation by macrophage-derived factor XIII. *Circ Res.* 2006;99:86-92.
278. Neal B, MacMahon S, Chapman N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Lancet.* 2000;356:1955-1964.
279. Hackam DG, Khan NA, Hemmelgarn BR, Rabkin SW, Touyz RM, Campbell NR, Padwal R, Campbell TS, Lindsay MP, Hill MD, Quinn RR, Mahon JL, Herman RJ, Schiffrin EL, Ruzicka M, Larochelle P, Feldman RD, Lebel M, Poirier L, Arnold JM, Moe GW, Howlett JG, Trudeau L, Bacon SL, Petrella RJ, Milot A, Stone JA, Drouin D, Boulanger JM, Sharma M, Hamet P, Fodor G, Dresser GK, Carruthers SG, Pylypchuk G, Burgess ED, Burns KD, Vallee M, Prasad GV, Gilbert RE, Leiter LA, Jones C, Ogilvie RI, Woo V, McFarlane PA, Hegele RA, Tobe SW. The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 2 - therapy. *Can J Cardiol*;26:249-258.
280. <http://hypertension.ca/chep/fr/>.
281. Osler W. *The principles and practice of medicine, designed for the use of practitioners and students of medicine.* New York,; D. Appleton and company; 1898.
282. O'Rourke MF, Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1-13.
283. Keeley FW, Alatawi A. Response of aortic elastin synthesis and accumulation to developing hypertension and the inhibitory effect of colchicine on this response. *Lab Invest.* 1991;64:499-507.

284. O'Rourke MF. Pulsatile arterial haemodynamics in hypertension. *Aust N Z J Med.* 1976;6 suppl 2:40-48.
285. Avolio A, Jones D, Tafazzoli-Shadpour M. Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media. *Hypertension.* 1998;32:170-175.
286. Davis E. Mechanical and morphological characteristics of elastin from conduit artery. London: University of London; 2005.
287. Greenwald SE. Ageing of the conduit arteries. *J Pathol.* 2007;211:157-172.
288. Hornebeck W, Derouette JC, Roland J, Chatelet F, Bouissou H, Robert L. [Correlation between age, arteriosclerosis and elastolytic activity of human aorta wall]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1976;282:2003-2006.
289. Li Z, Froehlich J, Galis ZS, Lakatta EG. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension.* 1999;33:116-123.
290. Wang M, Lakatta EG. Altered regulation of matrix metalloproteinase-2 in aortic remodeling during aging. *Hypertension.* 2002;39:865-873.
291. McNulty M, Spiers P, McGovern E, Feely J. Aging is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity in the human aorta. *Am J Hypertens.* 2005;18:504-509.
292. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 1998;102:1900-1910.
293. Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery.* 1997;122:264-271; discussion 271-262.
294. Xiong W, Knispel RA, Dietz HC, Ramirez F, Baxter BT. Doxycycline delays aneurysm rupture in a mouse model of Marfan syndrome. *J Vasc Surg.* 2008;47:166-172; discussion 172.
295. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 2003;107:1579-1585.
296. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9),

- MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:372.
297. Medley TL, Cole TJ, Dart AM, Gatzka CD, Kingwell BA. Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1479-1484.
298. Yasmin, McEniery CM, O'Shaughnessy KM, Harnett P, Arshad A, Wallace S, Maki-Petaja K, McDonnell B, Ashby MJ, Brown J, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1799-1805.
299. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol*;7:528-536.
300. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1161-1170.
301. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1512-1531.
302. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnke-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2857-2867.
303. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1983;172:173-177.
304. Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC. Calcification in atherosclerosis. I. Human studies. *J Exp Pathol.* 1986;2:261-273.
305. Chalajour F, Treede H, Ebrahimnejad A, Lauke H, Reichenspurner H, Ergun S. Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis. *Exp Cell Res.* 2004;298:455-464.
306. Soini Y, Salo T, Satta J. Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Hum Pathol.* 2003;34:756-763.

307. Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, Spelsberg TC, McCarthy PM, Rahimtoola SH, Rajamannan NM. Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:1707-1712.
308. Karsenty G. Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2001;142:2731-2733.
309. Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev.* 2001;106:97-106.
310. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation.* 2003;107:2181-2184.
311. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286:E686-696.
312. Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER, 3rd. Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke.* 2002;33:1214-1219.
313. Qiao JH, Mertens RB, Fishbein MC, Geller SA. Cartilaginous metaplasia in calcified diabetic peripheral vascular disease: morphologic evidence of enchondral ossification. *Hum Pathol.* 2003;34:402-407.
314. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1993;91:1800-1809.
315. Bunting CH. The Formation of True Bone with Cellular (Red) Marrow in a Sclerotic Aorta. *J Exp Med.* 1906;8:365-376.
316. Soor GS, Vukin I, Leong SW, Oreopoulos G, Butany J. Peripheral vascular disease: who gets it and why? A histomorphological analysis of 261 arterial segments from 58 cases. *Pathology.* 2008;40:385-391.
317. Blumenthal HT, Lansing AI, Wheeler PA. Calcification of the Media of the Human Aorta and Its Relation to Intimal Arteriosclerosis, Ageing and Disease. *Am J Pathol.* 1944;20:665-687.

318. Elliott RJ, McGrath LT. Calcification of the human thoracic aorta during aging. *Calcif Tissue Int.* 1994;54:268-273.
319. Bertelsen S. Hexosamine, hydroxyproline, and calcium levels in the intima of the human aorta as related to age and atherosclerotic changes. *J Gerontol.* 1962;17:24-26.
320. Lansing AI, Alex M, Rosenthal TB. Calcium and elastin in human arteriosclerosis. *J Gerontol.* 1950;5:112-119.
321. Boskey AL. Matrix proteins and mineralization: an overview. *Connect Tissue Res.* 1996;35:357-363.
322. Lansing AI, Rosenthal TB, Alex M, Dempsey EW. The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *Anat Rec.* 1952;114:555-575.
323. Nejjar I, Pieraggi MT, Thiers JC, Bouissou H. Age-related changes in the elastic tissue of the human thoracic aorta. *Atherosclerosis.* 1990;80:199-208.
324. Seligman M, Eilberg RF, Fishman L. Mineralization of elastin extracted from human aortic tissues. *Calcif Tissue Res.* 1975;17:229-234.
325. Simionescu A, Simionescu D, Deac R. Biochemical pathways of tissue degeneration in bioprosthetic cardiac valves. The role of matrix metalloproteinases. *ASAIO J.* 1996;42:M561-567.
326. Simionescu D, Simionescu A, Deac R. Detection of remnant proteolytic activities in unimplanted glutaraldehyde-treated bovine pericardium and explanted cardiac bioprostheses. *J Biomed Mater Res.* 1993;27:821-829.
327. Vyavahare N, Jones PL, Tallapragada S, Levy RJ. Inhibition of matrix metalloproteinase activity attenuates tenascin-C production and calcification of implanted purified elastin in rats. *Am J Pathol.* 2000;157:885-893.
328. Bailey M, Pillarisetti S, Jones P, Xiao H, Simionescu D, Vyavahare N. Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification. *Cardiovasc Pathol.* 2004;13:146-155.
329. Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation.* 2004;110:3480-3487.
330. Simionescu A, Philips K, Vyavahare N. Elastin-derived peptides and TGF-beta1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:524-532.

331. Simionescu A, Simionescu DT, Vyavahare NR. Osteogenic responses in fibroblasts activated by elastin degradation products and transforming growth factor-beta1: role of myofibroblasts in vascular calcification. *Am J Pathol.* 2007;171:116-123.
332. Bielak LF, Turner ST, Franklin SS, Sheedy PF, 2nd, Peyser PA. Age-dependent associations between blood pressure and coronary artery calcification in asymptomatic adults. *J Hypertens.* 2004;22:719-725.
333. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens.* 2003;16:103-110.
334. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:1014-1021.
335. Niederhoffer N, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Duvivier C, Peslin R, Atkinson J. Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity. *Hypertension.* 1997;29:999-1006.
336. Spina M, Garbisa S, Hinnie J, Hunter JC, Serafini-Fracassini A. Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta. *Arteriosclerosis.* 1983;3:64-76.
337. Lakatta EG. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol Rev.* 1993;73:413-467.
338. Watanabe M, Sawai T, Nagura H, Suyama K. Age-related alteration of cross-linking amino acids of elastin in human aorta. *Tohoku J Exp Med.* 1996;180:115-130.
339. Griffin M, Smith LL, Wynne J. Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. *Br J Exp Pathol.* 1979;60:653-661.
340. Johnson TS, Fisher M, Haylor JL, Hau Z, Skill NJ, Jones R, Saint R, Coutts I, Vickers ME, El Nahas AM, Griffin M. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:3078-3088.
341. Small K, Feng JF, Lorenz J, Donnelly ET, Yu A, Im MJ, Dorn GW, 2nd, Liggett SB. Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophy phenotype independent of phospholipase C activation. *J Biol Chem.* 1999;274:21291-21296.

342. Monnier VM, Sell DR. Prevention and repair of protein damage by the Maillard reaction in vivo. *Rejuvenation Res.* 2006;9:264-273.
343. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens.* 2003;21:3-12.
344. Wolffenbittel BH, Boulanger CM, Crijns FR, Huijberts MS, Poitevin P, Swennen GN, Vasan S, Egan JJ, Ulrich P, Cerami A, Levy BI. Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:4630-4634.
345. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:767-801.
346. Cliff WJ. The aortic tunica media in aging rats. *Exp Mol Pathol.* 1970;13:172-189.
347. Orlandi A, Mauriello A, Marino B, Spagnoli LG. Age-related modifications of aorta and coronaries in the rabbit: a morphological and morphometrical assessment. *Arch Gerontol Geriatr.* 1993;17:37-53.
348. Corman B, Duriez M, Poitevin P, Heudes D, Bruneval P, Tedgui A, Levy BI. Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:1301-1306.
349. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
350. Yamamoto M, Yamamoto K, Noumura T. Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Exp Cell Res.* 1993;204:121-129.
351. Hirose M, Kosugi H, Nakazato K, Hayashi T. Restoration to a quiescent and contractile phenotype from a proliferative phenotype of myofibroblast-like human aortic smooth muscle cells by culture on type IV collagen gels. *J Biochem.* 1999;125:991-1000.
352. Li Z, Cheng H, Lederer WJ, Froehlich J, Lakatta EG. Enhanced proliferation and migration and altered cytoskeletal proteins in early passage smooth muscle cells from young and old rat aortic explants. *Exp Mol Pathol.* 1997;64:1-11.
353. Diez J. Arterial stiffness and extracellular matrix. *Adv Cardiol.* 2007;44:76-95.

354. van de Schans VA, Smits JF, Blankesteyn WM. The Wnt/frizzled pathway in cardiovascular development and disease: friend or foe? *Eur J Pharmacol*. 2008;585:338-345.
355. Kimelman D, Xu W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*. 2006;25:7482-7491.
356. Kapoor M, Liu S, Shi-wen X, Huh K, McCann M, Denton CP, Woodgett JR, Abraham DJ, Leask A. GSK-3beta in mouse fibroblasts controls wound healing and fibrosis through an endothelin-1-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 2008;118:3279-3290.
357. Burton DG, Giles PJ, Sheerin AN, Smith SK, Lawton JJ, Ostler EL, Rhys-Williams W, Kipling D, Faragher RG. Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: A link to atherosclerosis and vascular calcification. *Exp Gerontol*. 2009;44:659-665.
358. Fu Z, Wang M, Gucek M, Zhang J, Wu J, Jiang L, Monticone RE, Khazan B, Telljohann R, Mattison J, Sheng S, Cole RN, Spinetti G, Pintus G, Liu L, Kolodgie FD, Virmani R, Spurgeon H, Ingram DK, Everett AD, Lakatta EG, Van Eyk JE. Milk fat globule protein epidermal growth factor-8: a pivotal relay element within the angiotensin II and monocyte chemoattractant protein-1 signaling cascade mediating vascular smooth muscle cells invasion. *Circ Res*. 2009;104:1337-1346.
359. Faury G. Role of the elastin-laminin receptor in the cardiovascular system. *Pathol Biol (Paris)*. 1998;46:517-526.
360. Mochizuki S, Brassart B, Hinek A. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2002;277:44854-44863.
361. Varga Z, Jacob MP, Csongor J, Robert L, Leovey A, Fulop T, Jr. Altered phosphatidylinositol breakdown after K-elastin stimulation in PMNLs of elderly. *Mech Ageing Dev*. 1990;52:61-70.
362. Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER, 3rd, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg*. 2003;75:457-465; discussion 465-456.
363. Wang M, Monticone RE, Lakatta EG. Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*;19:201-207.
364. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A, Reutelingsperger CP, Cleutjens JP, Vermeer C. Novel conformation-specific

- antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1629-1633.
365. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* 1997;386:78-81.
366. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:471-476.
367. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation.* 1995;91:1981-1987.
368. Singh N, Prasad S, Singer DR, MacAllister RJ. Ageing is associated with impairment of nitric oxide and prostanoid dilator pathways in the human forearm. *Clin Sci (Lond).* 2002;102:595-600.
369. Hatake K, Kakishita E, Wakabayashi I, Sakiyama N, Hishida S. Effect of aging on endothelium-dependent vascular relaxation of isolated human basilar artery to thrombin and bradykinin. *Stroke.* 1990;21:1039-1043.
370. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Kuga T, Urabe Y, Takeshita A. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation.* 1993;88:77-81.
371. Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, Malinski T, Luscher TF. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest.* 1996;98:899-905.
372. Tanabe T, Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Takanashi M, Irukayama-Tomobe Y, Yokota T, Ohmori H, Matsuda M. Exercise training improves ageing-induced decrease in eNOS expression of the aorta. *Acta Physiol Scand.* 2003;178:3-10.
373. Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res.* 2002;90:1159-1166.
374. Lamberts SW, van den Beld AW, van der Lely AJ. The endocrinology of aging. *Science.* 1997;278:419-424.

375. Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. *Steroids*. 2004;69:279-289.
376. Goettsch W, Lattmann T, Amann K, Szibor M, Morawietz H, Munter K, Muller SP, Shaw S, Barton M. Increased expression of endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase isoform II in aging arteries in vivo: implications for atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280:908-913.
377. Knothe C, Boldt J, Zickmann B, Ballesteros M, Dapper F, Hempelmann G. Endothelin plasma levels in old and young patients during open heart surgery: correlations to cardiopulmonary and endocrinology parameters. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20:664-670.
378. Kumazaki T. Modulation of gene expression during aging of human vascular endothelial cells. *Hiroshima J Med Sci*. 1993;42:97-100.
379. Kumazaki T, Wadhwa R, Kaul SC, Mitsui Y. Expression of endothelin, fibronectin, and mortalin as aging and mortality markers. *Exp Gerontol*. 1997;32:95-103.
380. White M, Courtemanche M, Stewart DJ, Talajic M, Mikes E, Cernacek P, Vantrimpont P, Leclerc D, Bussieres L, Rouleau JL. Age- and gender-related changes in endothelin and catecholamine release, and in autonomic balance in response to head-up tilt. *Clin Sci (Lond)*. 1997;93:309-316.
381. Wedgwood S, Black SM. Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation of hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288:L480-487.
382. Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2004;110:2233-2240.
383. Shreenivas S, Oparil S. The role of endothelin-1 in human hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007;37:157-178.
384. Dao HH, Bouvet C, Moreau S, Beaucage P, Lariviere R, Servant MJ, de Champlain J, Moreau P. Endothelin is a dose-dependent trophic factor and a mitogen in small arteries in vivo. *Cardiovasc Res*. 2006;71:61-68.
385. Park JB, Schiffrin EL. ET(A) receptor antagonist prevents blood pressure elevation and vascular remodeling in aldosterone-infused rats. *Hypertension*. 2001;37:1444-1449.

386. Rizvi MA, Katwa L, Spadone DP, Myers PR. The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:243-252.
387. Tharaux PL, Chatziantoniou C, Casellas D, Fouassier L, Ardaillou R, Dussaule JC. Vascular endothelin-1 gene expression and synthesis and effect on renal type I collagen synthesis and nephroangiosclerosis during nitric oxide synthase inhibition in rats. *Circulation.* 1999;99:2185-2191.
388. Dao HH, Essalihi R, Graillon JF, Lariviere R, De Champlain J, Moreau P. Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens.* 2002;20:1597-1606.
389. Essalihi R, Dao HH, Gilbert LA, Bouvet C, Semerjian Y, McKee MD, Moreau P. Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation.* 2005;112:1628-1635.
390. Essalihi R, Ouellette V, Dao HH, McKee MD, Moreau P. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during medial arterial calcification: a role for endothelin? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44 Suppl 1:S147-150.
391. Essalihi R, Zandvliet ML, Moreau S, Gilbert LA, Bouvet C, Lenoel C, Nekka F, McKee MD, Moreau P. Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens.* 2007;25:1879-1886.
392. Wu SY, Zhang BH, Pan CS, Jiang HF, Pang YZ, Tang CS, Qi YF. Endothelin-1 is a potent regulator in vivo in vascular calcification and in vitro in calcification of vascular smooth muscle cells. *Peptides.* 2003;24:1149-1156.
393. Asmar R, Benetos A, Topouchian J, Laurent P, Pannier B, Brisac AM, Target R, Levy BI. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. *Hypertension.* 1995;26:485-490.
394. Sutton-Tyrrell K, Mackey RH, Holubkov R, Vaitkevicius PV, Spurgeon HA, Lakatta EG. Measurement variation of aortic pulse wave velocity in the elderly. *Am J Hypertens.* 2001;14:463-468.
395. Wilkinson IB, Fuchs SA, Jansen IM, Spratt JC, Murray GD, Cockcroft JR, Webb DJ. Reproducibility of pulse wave velocity and augmentation index measured by pulse wave analysis. *J Hypertens.* 1998;16:2079-2084.
396. Oliver JJ, Webb DJ. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:554-566.

397. Hamilton PK, Lockhart CJ, Quinn CE, McVeigh GE. Arterial stiffness: clinical relevance, measurement and treatment. *Clin Sci (Lond)*. 2007;113:157-170.
398. Nichols WW, O'Rourke MF. *McDonald's Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical Principles*. London: Arnold; 2005.
399. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27:2588-2605.
400. DeLoach SS, Townsend RR. Vascular stiffness: its measurement and significance for epidemiologic and outcome studies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:184-192.
401. Izzo JL, Jr., Shykoff BE. Arterial stiffness: clinical relevance, measurement, and treatment. *Rev Cardiovasc Med*. 2001;2:29-34, 37-40.
402. Izzo JL, Jr. Arterial stiffness and the systolic hypertension syndrome. *Curr Opin Cardiol*. 2004;19:341-352.
403. Safar M, Henry O, Meaume S. *Aortic Pulse Wave Velocity: Measurement of Aortic PWV*. Paris; 2002.
404. Izzo JL, Jr., Mitchell GF. Aging and arterial structure-function relations. *Adv Cardiol*. 2007;44:19-34.
405. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*. 1995;25:305-313.
406. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA*. 1996;275:1557-1562.
407. Katz AM. Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1990;322:100-110.
408. Ferro G, Duilio C, Spinelli L, Liucci GA, Mazza F, Indolfi C. Relation between diastolic perfusion time and coronary artery stenosis during stress-induced myocardial ischemia. *Circulation*. 1995;92:342-347.
409. Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, Vasan RS, Levy D. Changes in arterial stiffness and wave reflection with advancing

- age in healthy men and women: the Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2004;43:1239-1245.
410. O'Rourke MF, Safar ME. Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy. *Hypertension*. 2005;46:200-204.
 411. Greenberg SM. Small vessels, big problems. *N Engl J Med*. 2006;354:1451-1453.
 412. Safar ME. Peripheral pulse pressure, large arteries, and microvessels. *Hypertension*. 2004;44:121-122.
 413. Tanaka H, Dinunno FA, Monahan KD, Clevenger CM, DeSouza CA, Seals DR. Aging, habitual exercise, and dynamic arterial compliance. *Circulation*. 2000;102:1270-1275.
 414. Vaitkevicius PV, Fleg JL, Engel JH, O'Connor FC, Wright JG, Lakatta LE, Yin FC, Lakatta EG. Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults. *Circulation*. 1993;88:1456-1462.
 415. Cameron JD, Dart AM. Exercise training increases total systemic arterial compliance in humans. *Am J Physiol*. 1994;266:H693-701.
 416. Bertovic DA, Waddell TK, Gatzka CD, Cameron JD, Dart AM, Kingwell BA. Muscular strength training is associated with low arterial compliance and high pulse pressure. *Hypertension*. 1999;33:1385-1391.
 417. Green DJ, Bilsborough W, Naylor LH, Reed C, Wright J, O'Driscoll G, Walsh JH. Comparison of forearm blood flow responses to incremental handgrip and cycle ergometer exercise: relative contribution of nitric oxide. *J Physiol*. 2005;562:617-628.
 418. Seifalian AM, Filippatos TD, Joshi J, Mikhailidis DP. Obesity and arterial compliance alterations. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010;8:155-168.
 419. Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:932-943.
 420. Teede HJ, McGrath BP, DeSilva L, Cehun M, Fassoulakis A, Nestel PJ. Isoflavones reduce arterial stiffness: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1066-1071.
 421. van der Schouw YT, Pijpe A, Lebrun CE, Bots ML, Peeters PH, van Staveren WA, Lamberts SW, Grobbee DE. Higher usual dietary intake of

- phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1316-1322.
422. Limas C, Westrum B, Limas CJ, Cohn JN. Effect of salt on the vascular lesions of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1980;2:477-489.
423. Boddi M, Poggesi L, Coppo M, Zarone N, Sacchi S, Tania C, Neri Serneri GG. Human vascular renin-angiotensin system and its functional changes in relation to different sodium intakes. *Hypertension.* 1998;31:836-842.
424. Levy BI, Poitevin P, Duriez M, Guez DC, Schiavi PD, Safar ME. Sodium, survival, and the mechanical properties of the carotid artery in stroke-prone hypertensive rats. *J Hypertens.* 1997;15:251-258.
425. Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y. Biomechanical properties and chemical composition of the aorta in genetic hypertensive rats. *J Hypertens.* 1999;17:481-487.
426. Bagrov AY, Lakatta EG. The dietary sodium-blood pressure plot "stiffens". *Hypertension.* 2004;44:22-24.
427. Gates PE, Tanaka H, Hiatt WR, Seals DR. Dietary sodium restriction rapidly improves large elastic artery compliance in older adults with systolic hypertension. *Hypertension.* 2004;44:35-41.
428. Appel LJ, Espeland MA, Easter L, Wilson AC, Folmar S, Lacy CR. Effects of reduced sodium intake on hypertension control in older individuals: results from the Trial of Nonpharmacologic Interventions in the Elderly (TONE). *Arch Intern Med.* 2001;161:685-693.
429. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation.* 2003;107:139-146.
430. Safar M, O'Rourke M. *Arterial Stiffness in Hypertension. Handbook of Hypertension.* Edinburgh: Elsevier; 2006.
431. Franklin SS, Jacobs MJ, Wong ND, L'Italien GJ, Lapuerta P. Predominance of isolated systolic hypertension among middle-aged and elderly US hypertensives: analysis based on National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. *Hypertension.* 2001;37:869-874.
432. Burt VL, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D, Whelton P, Brown C, Roccella EJ. Trends in the prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the adult US population. Data from the health examination surveys, 1960 to 1991. *Hypertension.* 1995;26:60-69.

433. Izzo JL, Jr., Levy D, Black HR. Clinical Advisory Statement. Importance of systolic blood pressure in older Americans. *Hypertension*. 2000;35:1021-1024.
434. Dao HH, Essalihi R, Bouvet C, Moreau P. Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc Res*. 2005;66:307-317.
435. Asmar RG, London GM, O'Rourke ME, Safar ME. Improvement in blood pressure, arterial stiffness and wave reflections with a very-low-dose perindopril/indapamide combination in hypertensive patient: a comparison with atenolol. *Hypertension*. 2001;38:922-926.
436. London GM, Asmar RG, O'Rourke MF, Safar ME. Mechanism(s) of selective systolic blood pressure reduction after a low-dose combination of perindopril/indapamide in hypertensive subjects: comparison with atenolol. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:92-99.
437. Nichols WW, Edwards DG. Arterial elastance and wave reflection augmentation of systolic blood pressure: deleterious effects and implications for therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2001;6:5-21.
438. Nichols WW, Singh BM. Augmentation index as a measure of peripheral vascular disease state. *Curr Opin Cardiol*. 2002;17:543-551.
439. O'Rourke MF, Pauca AL. Augmentation of the aortic and central arterial pressure waveform. *Blood Press Monit*. 2004;9:179-185.
440. Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). SHEP Cooperative Research Group. *JAMA*. 1991;265:3255-3264.
441. Staessen JA, Fagard R, Thijs L, Celis H, Arabidze GG, Birkenhager WH, Bulpitt CJ, de Leeuw PW, Dollery CT, Fletcher AE, Forette F, Leonetti G, Nachev C, O'Brien ET, Rosenfeld J, Rodicio JL, Tuomilehto J, Zanchetti A. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet*. 1997;350:757-764.
442. Larstorp AC, Okin PM, Devereux RB, Olsen MH, Ibsen H, Dahlof B, Kjeldsen SE, Wachtell K. Changes in electrocardiographic left ventricular hypertrophy and risk of major cardiovascular events in isolated systolic hypertension: The LIFE study. *J Hum Hypertens*.
443. Ogihara T, Saruta T, Rakugi H, Matsuoka H, Shimamoto K, Shimada K, Imai Y, Kikuchi K, Ito S, Eto T, Kimura G, Imaizumi T, Takishita S, Ueshima H.

- Target blood pressure for treatment of isolated systolic hypertension in the elderly: valsartan in elderly isolated systolic hypertension study. *Hypertension*;56:196-202.
444. Benetos A, Lacolley P, Safar ME. Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1152-1156.
445. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol.* 1993;25:563-575.
446. Lacolley P, Safar ME, Lucet B, Ledudal K, Labat C, Benetos A. Prevention of aortic and cardiac fibrosis by spironolactone in old normotensive rats. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:662-667.
447. Tokuda K, Kai H, Kuwahara F, Yasukawa H, Tahara N, Kudo H, Takemiya K, Koga M, Yamamoto T, Imaizumi T. Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. *Hypertension.* 2004;43:499-503.
448. Adamczak M, Gross ML, Amann K, Ritz E. Reversal of glomerular lesions involves coordinated restructuring of glomerular microvasculature. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:3063-3072.
449. Adamczak M, Gross ML, Krtil J, Koch A, Tyralla K, Amann K, Ritz E. Reversal of glomerulosclerosis after high-dose enalapril treatment in subtotaly nephrectomized rats. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:2833-2842.
450. Boffa JJ, Lu Y, Placier S, Stefanski A, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1132-1144.
451. Ma LJ, Nakamura S, Whitsitt JS, Marcantoni C, Davidson JM, Fogo AB. Regression of sclerosis in aging by an angiotensin inhibition-induced decrease in PAI-1. *Kidney Int.* 2000;58:2425-2436.
452. Boffa JJ, Tharaux PL, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Regression of renal vascular fibrosis by endothelin receptor antagonism. *Hypertension.* 2001;37:490-496.
453. Duchier J, Iannascoli F, Safar M. Antihypertensive effect of sustained-release isosorbide dinitrate for isolated systolic systemic hypertension in the elderly. *Am J Cardiol.* 1987;60:99-102.

454. Stokes GS, Ryan M. Can Extended-Release Isosorbide Mononitrate be Used as Adjunctive Therapy for Systolic Hypertension? An Open Study Employing Pulse-Wave Analysis to Determine Effects of Antihypertensive Therapy. *Am J Geriatr Cardiol.* 1997;6:11-19.
455. Stokes GS, Ryan M, Brnabic A, Nyberg G. A controlled study of the effects of isosorbide mononitrate on arterial blood pressure and pulse wave form in systolic hypertension. *J Hypertens.* 1999;17:1767-1773.
456. Vlachopoulos C, Hirata K, O'Rourke MF. Effect of sildenafil on arterial stiffness and wave reflection. *Vasc Med.* 2003;8:243-248.
457. Gilbert L-A. Rôle du monoxyde d'azote dans la calcification vasculaire et la rigidité artérielle dans un modèle d'hypertension systolique isolée *Faculté de Pharmacie.* Montréal: Université de Montréal; 2010.
458. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res.* 2002;90:1243-1250.
459. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399:601-605.
460. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 2000;6:1004-1010.
461. McFarlane SI, Muniyappa R, Shin JJ, Bahtiyar G, Sowers JR. Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boned arteries, is there a link? *Endocrine.* 2004;23:1-10.
462. Persy V, D'Haese P. Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. *Trends Mol Med.* 2009;15:405-416.
463. Szulc P, Kiel DP, Delmas PD. Calcifications in the abdominal aorta predict fractures in men: MINOS study. *J Bone Miner Res.* 2008;23:95-102.
464. Hirose K, Tomiyama H, Okazaki R, Arai T, Koji Y, Zaydun G, Hori S, Yamashina A. Increased pulse wave velocity associated with reduced calcaneal quantitative osteo-sono index: possible relationship between atherosclerosis and osteopenia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:2573-2578.
465. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:817-824.

466. Persy V, De Broe M, Ketteler M. Bisphosphonates prevent experimental vascular calcification: Treat the bone to cure the vessels? *Kidney Int.* 2006;70:1537-1538.
467. Johnson K, Polewski M, van Etten D, Terkeltaub R. Chondrogenesis mediated by PPI depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:686-691.
468. Shao JS, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1423-1430.
469. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev.* 1998;19:80-100.
470. Vaitkevicius PV, Lane M, Spurgeon H, Ingram DK, Roth GS, Egan JJ, Vasani S, Wagle DR, Ulrich P, Brines M, Wuerth JP, Cerami A, Lakatta EG. A cross-link breaker has sustained effects on arterial and ventricular properties in older rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1171-1175.
471. Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroot RC, Lakatta EG. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation.* 2001;104:1464-1470.
472. Little WC, Zile MR, Kitzman DW, Hundley WG, O'Brien TX, Degroot RC. The effect of alagebrium chloride (ALT-711), a novel glucose cross-link breaker, in the treatment of elderly patients with diastolic heart failure. *J Card Fail.* 2005;11:191-195.
473. Atkinson J. Animal models of arterial stiffness. *Adv Cardiol.* 2007;44:96-116.
474. Rang HP. *Drug discovery and development : technology in transition.* Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone / Elsevier; 2006.
475. Roy CS. The Elastic Properties of the Arterial Wall. *J Physiol.* 1881;3:125-159.
476. Angouras D, Sokolis DP, Dosios T, Kostomitsopoulos N, Boudoulas H, Skalkas G, Karayannacos PE. Effect of impaired vasa vasorum flow on the structure and mechanics of the thoracic aorta: implications for the pathogenesis of aortic dissection. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000;17:468-473.
477. Saeki A, Recchia F, Kass DA. systolic flow augmentation in hearts ejecting into a model of stiff aging vasculature. Influence on myocardial perfusion-demand balance. *Circ Res.* 1995;76:132-141.

478. Kieffer P, Robert A, Capdeville-Atkinson C, Atkinson J, Lartaud-Idjouadiene I. Age-related arterial calcification in rats. *Life Sci.* 2000;66:2371-2381.
479. Michel JB, Heudes D, Michel O, Poitevin P, Philippe M, Scalbert E, Corman B, Levy BI. Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries. *Am J Physiol.* 1994;267:R124-135.
480. Schurgers LJ, Cranenburg EC, Vermeer C. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost.* 2008;100:593-603.
481. Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol.* 2004;165:625-630.
482. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* 1993;7:1475-1482.
483. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner.* 1993;22:147-159.
484. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med.* 2002;196:1047-1055.
485. Fleckenstein A, Frey M, Zorn J, Fleckenstein-Grun G. Experimental basis of the long-term therapy of arterial hypertension with calcium antagonists. *Am J Cardiol.* 1985;56:3H-14H.
486. Gaillard V, Casellas D, Seguin-Devaux C, Schohn H, Dauca M, Atkinson J, Lartaud I. Pioglitazone improves aortic wall elasticity in a rat model of elastocalcinotic arteriosclerosis. *Hypertension.* 2005;46:372-379.
487. Niederhoffer N, Bobryshev YV, Lartaud-Idjouadiene I, Giummelly P, Atkinson J. Aortic calcification produced by vitamin D3 plus nicotine. *J Vasc Res.* 1997;34:386-398.
488. Thorin E, Henrion D, Oster L, Thorin-Trescases N, Capdeville C, Martin JA, Chillon JM, Hicks PE, Atkinson J. Vascular calcium overload produced by administration of vitamin D3 and nicotine in rats. Changes in tissue calcium levels, blood pressure, and pressor responses to electrical stimulation or norepinephrine in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16:257-266.

489. Zhou YB, Jin SJ, Cai Y, Teng X, Chen L, Tang CS, Qi YF. Lanthanum acetate inhibits vascular calcification induced by vitamin D3 plus nicotine in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009;234:908-917.
490. Ryan ST, Koteliansky VE, Gotwals PJ, Lindner V. Transforming growth factor-beta-dependent events in vascular remodeling following arterial injury. *J Vasc Res*. 2003;40:37-46.
491. Shanahan CM, Proudfoot D, Farzaneh-Far A, Weissberg PL. The role of Gla proteins in vascular calcification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1998;8:357-375.
492. Romberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry*. 1986;25:1176-1180.
493. Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost*. 1999;82:1764-1767.
494. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1400-1407.
495. Mune S, Shibata M, Hatamura I, Saji F, Okada T, Maeda Y, Sakaguchi T, Negi S, Shigematsu T. Mechanism of phosphate-induced calcification in rat aortic tissue culture: possible involvement of Pit-1 and apoptosis. *Clin Exp Nephrol*. 2009;13:571-577.
496. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*. 2002;62:1724-1731.
497. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*. 2000;87:E10-17.
498. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:2003-2009.
499. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res*. 2001;89:1147-1154.

500. Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1392-1401.
501. Qin X, Corriere MA, Matrisian LM, Guzman RJ. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1510-1516.
502. Jarvelainen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2009;61:198-223.
503. Baker DE. Natalizumab: overview of its pharmacology and safety. *Rev Gastroenterol Disord*. 2007;7:38-46.
504. Rosove MH. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2004;17:65-76.
505. Schon MP. Efalizumab in the treatment of psoriasis: mode of action, clinical indications, efficacy, and safety. *Clin Dermatol*. 2008;26:509-514.
506. Gordon KJ, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782:197-228.
507. Denton CP, Merkel PA, Furst DE, Khanna D, Emery P, Hsu VM, Silliman N, Streisand J, Powell J, Akesson A, Coppock J, Hoogen F, Herrick A, Mayes MD, Veale D, Haas J, Ledbetter S, Korn JH, Black CM, Seibold JR. Recombinant human anti-transforming growth factor beta1 antibody therapy in systemic sclerosis: a multicenter, randomized, placebo-controlled phase I/II trial of CAT-192. *Arthritis Rheum*. 2007;56:323-333.
508. Bonafoux D, Lee WC. Strategies for TGF-beta modulation: a review of recent patents. *Expert Opin Ther Pat*. 2009;19:1759-1769.
509. Clinicaltrials.gov.
510. Eli Lilly New Molecular Entity Pipeline; 2010.
511. Kontani K, Kajino K, Huang CL, Fujino S, Taguchi O, Yamauchi A, Yokomise H, Ogasawara K. Spontaneous elicitation of potent antitumor immunity and eradication of established tumors by administration of DNA encoding soluble transforming growth factor-beta II receptor without active antigen-sensitization. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55:579-587.

512. Mohan RR, Gupta R, Mehan MK, Cowden JW, Sinha S. Decorin transfection suppresses profibrogenic genes and myofibroblast formation in human corneal fibroblasts. *Exp Eye Res*;91:238-245.
513. Uhl M, Aulwurm S, Wischhusen J, Weiler M, Ma JY, Almirez R, Mangadu R, Liu YW, Platten M, Herrlinger U, Murphy A, Wong DH, Wick W, Higgins LS, Weller M. SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2004;64:7954-7961.
514. http://www.antisense-pharma.com/bd/f_bd.htm.
515. Chabot N, Moreau S, Mulani A, Moreau P, Keillor J. Fluorescent probes of tissue transglutaminase reveal its association with arterial stiffness. *Chemistry and Biology*. 2010;17:1143-1150.
516. Andringa G, Lam KY, Chegary M, Wang X, Chase TN, Bennett MC. Tissue transglutaminase catalyzes the formation of alpha-synuclein crosslinks in Parkinson's disease. *FASEB J*. 2004;18:932-934.
517. Muma NA. Transglutaminase is linked to neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66:258-263.
518. Wilhelmus MM, Grunberg SC, Bol JG, van Dam AM, Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, Drukarch B. Transglutaminases and transglutaminase-catalyzed cross-links colocalize with the pathological lesions in Alzheimer's disease brain. *Brain Pathol*. 2009;19:612-622.
519. Zainelli GM, Ross CA, Troncoso JC, Muma NA. Transglutaminase cross-links in intranuclear inclusions in Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62:14-24.
520. Dedeoglu A, Kubilus JK, Jeitner TM, Matson SA, Bogdanov M, Kowall NW, Matson WR, Cooper AJ, Ratan RR, Beal MF, Hersch SM, Ferrante RJ. Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 2002;22:8942-8950.
521. Junn E, Ronchetti RD, Quezado MM, Kim SY, Mouradian MM. Tissue transglutaminase-induced aggregation of alpha-synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:2047-2052.
522. Stack EC, Ferro JL, Kim J, Del Signore SJ, Goodrich S, Matson S, Hunt BB, Cormier K, Smith K, Matson WR, Ryu H, Ferrante RJ. Therapeutic

- attenuation of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurotoxin models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782:151-162.
523. Van Raamsdonk JM, Pearson J, Bailey CD, Rogers DA, Johnson GV, Hayden MR, Leavitt BR. Cystamine treatment is neuroprotective in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *J Neurochem*. 2005;95:210-220.
524. Bailey CD, Johnson GV. Tissue transglutaminase contributes to disease progression in the R6/2 Huntington's disease mouse model via aggregate-independent mechanisms. *J Neurochem*. 2005;92:83-92.
525. Lauer P, Metzner HJ, Zettlmeissl G, Li M, Smith AG, Lathe R, Dickneite G. Targeted inactivation of the mouse locus encoding coagulation factor XIII-A: hemostatic abnormalities in mutant mice and characterization of the coagulation deficit. *Thromb Haemost*. 2002;88:967-974.
526. Nahrendorf M, Weissleder R, Ertl G. Does FXIII deficiency impair wound healing after myocardial infarction? *PLoS One*. 2006;1:e48.
527. Kotsakis P, Griffin M. Tissue transglutaminase in tumour progression: friend or foe? *Amino Acids*. 2007;33:373-384.
528. Qiao SW, Piper J, Haraldsen G, Oynebraten I, Fleckenstein B, Molberg O, Khosla C, Sollid LM. Tissue transglutaminase-mediated formation and cleavage of histamine-gliadin complexes: biological effects and implications for celiac disease. *J Immunol*. 2005;174:1657-1663.
529. Shweke N, Boulos N, Jouanneau C, Vandermeersch S, Melino G, Dussaule JC, Chatziantoniou C, Ronco P, Boffa JJ. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. *Am J Pathol*. 2008;173:631-642.
530. Quan G, Choi JY, Lee DS, Lee SC. TGF-beta1 up-regulates transglutaminase two and fibronectin in dermal fibroblasts: a possible mechanism for the stabilization of tissue inflammation. *Arch Dermatol Res*. 2005;297:84-90.
531. Ritter SJ, Davies PJ. Identification of a transforming growth factor-beta1/bone morphogenetic protein 4 (TGF-beta1/BMP4) response element within the mouse tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem*. 1998;273:12798-12806.
532. Shin DM, Jeon JH, Kim CW, Cho SY, Lee HJ, Jang GY, Jeong EM, Lee DS, Kang JH, Melino G, Park SC, Kim IG. TGFbeta mediates activation of transglutaminase 2 in response to oxidative stress that leads to protein aggregation. *FASEB J*. 2008;22:2498-2507.

533. www.mmpharma.com.
534. Dorman G, Cseh S, Hajdu I, Barna L, Konya D, Kupai K, Kovacs L, Ferdinandy P. Matrix metalloproteinase inhibitors: a critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility. *Drugs*;70:949-964.
535. Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol*. 2003;138:532-543.
536. Sariahmetoglu M, Crawford BD, Leon H, Sawicka J, Li L, Ballermann BJ, Holmes C, Berthiaume LG, Holt A, Sawicki G, Schulz R. Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity by phosphorylation. *FASEB J*. 2007;21:2486-2495.
537. Dorman G, Kocsis-Szommer K, Spadoni C, Ferdinandy P. MMP inhibitors in cardiac diseases: an update. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*. 2007;2:186-194.
538. Giricz Z, Lalu MM, Csonka C, Bencsik P, Schulz R, Ferdinandy P. Hyperlipidemia attenuates the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning: role of matrix metalloproteinase-2 inhibition. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316:154-161.
539. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation*. 2000;101:1833-1839.
540. Lalaoui MZ, El Midaoui A, de Champlain J, Moreau P. Is there a role for reactive oxygen species in arterial medial elastocalcinosis? *Vascul Pharmacol*. 2007;46:201-206.
541. Bouvet C, Peeters W, Moreau S, DeBlois D, Moreau P. A new rat model of diabetic macrovascular complication. *Cardiovasc Res*. 2007;73:504-511.
542. Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson KL, Cary NR, Edmonds M, Weissberg PL. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol*. 2000;89 Suppl 2:63-68.
543. Duprez DA. Systolic hypertension in the elderly: addressing an unmet need. *Am J Med*. 2008;121:179-184 e173.
544. Williams B, Lacy PS, Thom SM, Cruickshank K, Stanton A, Collier D, Hughes AD, Thurston H, O'Rourke M. Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the

Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation.* 2006;113:1213-1225.

Annexes

Annexe 1

Fluorescent Probes of Tissue Transglutaminase

Reveal Its Association with Arterial Stiffening

Chemistry & Biology 2010; 17 (10) :1143-1150

Nicolas Chabot,^a Simon Moreau,^b Amina Mulani,^a Pierre Moreau,^b Jeffrey W. Keillor^{a,*}

^a*Département de chimie,*

^b*Faculté de pharmacie,*

Université de Montréal

C.P. 6128, Succursale centre-ville,

Montréal, Québec H3C 3J7

Canada

Running title: Fluorescent Probes of TG2

Key words: fluorescent probe, transglutaminase, arterial rigidification, hypertension

Abstract

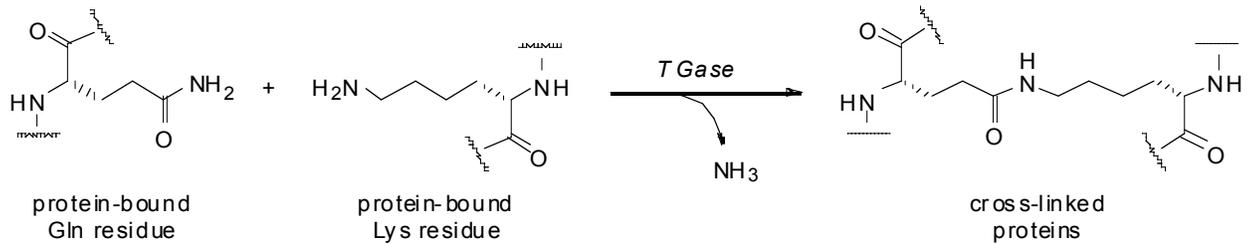
Tissue transglutaminase (TG2) catalyzes the cross-linking of proteins. TG2 has been implicated in fibrosis and vascular calcification, both of which lead to a common feature of ageing known as arterial stiffness. In order to probe the role of TG2 in arterial rigidification, we have prepared a fluorescent irreversible inhibitor as a probe for TG2 activity (RhodB-PGG-K(Acr)-LPF-OH). This probe was synthesized on solid support, characterized kinetically ($k_{\text{inact}} = 0.68 \text{ min}^{-1}$, $K_{\text{I}} = 79 \text{ }\mu\text{M}$) and then used to stain the aorta from rats used as a model of isolated systolic hypertension (ISH). Interestingly, TG2 activity was thus shown to increase over four weeks of the hypertension model, corresponding with the previously observed increase in arterial stiffness. These results clearly suggest an association between TG2 and the phenomenon of arterial rigidification.

Introduction

Transglutaminases (TGases) (EC 2.3.2.13) are a family of Ca^{2+} -dependent enzymes that catalyze an acyl transfer reaction from the γ -carboxamide group of a peptide-bound glutamine residue to the ϵ -amino group of a peptide-bound lysine residue, resulting in the formation of an isopeptidic amide bond that may cross-link peptides or proteins (Figure 1). Acyl transfer from glutamine to other primary amines and even water can also be mediated by TGases. (Achyuthan et al., 1993, Folk and Cole, 1966, Greenberg et al., 1991)

Mammalian TGases from tissue, epidermis and plasma have been extensively characterized. Of these, tissue TGase (TG2) has been shown to participate in biological processes such as endocytosis (Davies et al., 1980, Levitzki et al., 1980), apoptosis (Fesus et al., 1987) and cell growth regulation. (Birckbichler et al., 1983) TG2 is mostly a cytosolic protein, but it has also been detected in the nucleus (Lesort et al., 1988) and can be secreted from the cell. Outside the cell, it plays one of its most important biological roles, cross-linking the extracellular matrix (ECM), thus making it less susceptible to proteolytic degradation. (Aeschlimann and Thomazy, 2000) When TGase-mediated cross-linking activity is not carefully regulated, it may also be involved in a number of physiological disorders, such as acne (De Young et al., 1984), the formation of cataracts (Azari et al., 1981), immune system diseases (Fesus, 1982), psoriasis (Schroeder et al., 1992), Alzheimer's disease (Norlund et al., 1999, Selkoe et al., 1982), Huntington's disease (Dedeoglu et al., 2002, Mastroberardino et al., 2002), Celiac disease (Piper et al., 2002) and cancer metastasis (Choi et al., 2005, Mehta, 2009).

Figure 1 TGase-mediated protein cross-linking



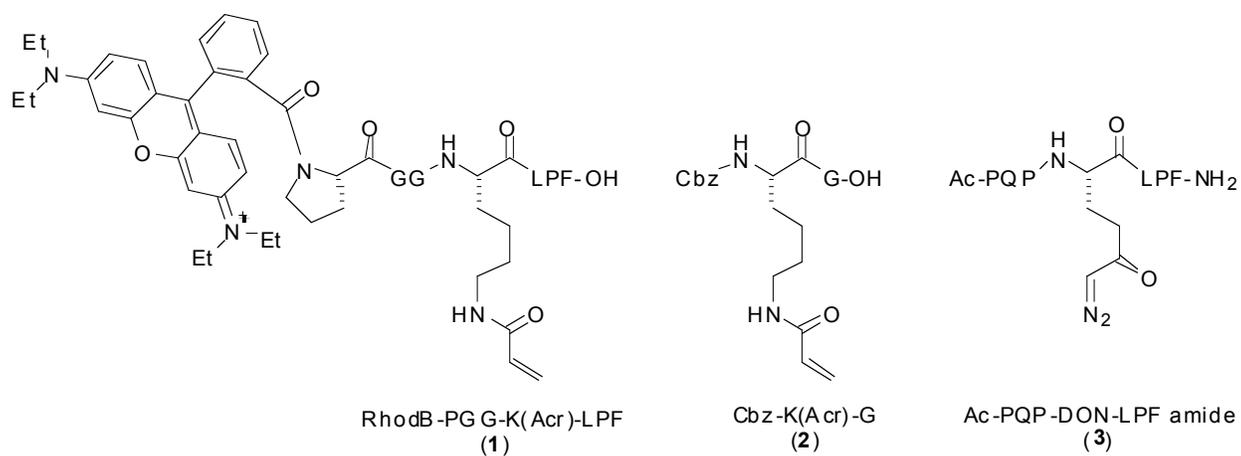
TG2 has also been implicated in fibrosis (Griffin et al., 1979, Johnson et al., 2007, Small et al., 1999) and vascular calcification (Faverman et al., 2008, Johnson et al., 2008, Kaartinen et al., 2007). In large conduit arteries, these two phenomena lead to a common feature of ageing known as arterial stiffness. Vascular calcification is an active phenomenon involving the modulation of matrix Gla protein (MGP) (Schurgers et al., 2008) and the phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells (Shanahan et al., 2000). On the other hand, fibrosis may be explained by an increased collagen/elastin ratio in the extracellular matrix (Johnson et al., 2001). As we described previously, this is due to elastin degradation (Bouvet et al., 2008) as well as the accumulation of collagen (Essalihi et al., 2007). Transglutaminase has been shown to participate in this phenomenon by cross-linking collagen in the extracellular matrix. (Ientile et al., 2007, Johnson et al., 2007, Johnson et al., 1997). The collagen network being rather rigid, its accumulation in arteries has been associated with increased vascular stiffness (Arribas et al., 2006, Bruel et al., 1998, Safar et al., 2003, Zieman et al., 2005).

The hemodynamic consequences of arterial stiffening are an increased systolic blood pressure (SBP), unchanged or slightly reduced diastolic blood pressure (DBP),

increased pulse pressure (PP) and the development of isolated systolic hypertension (ISH). We have developed a rat model of ISH, known as the warfarin/vitamin K (WVK) model, which mimics the physiopathological process of the disease observed in man (Bouvet et al., 2008, Essalihi et al., 2005, Essalihi et al., 2003, Essalihi et al., 2004). It consists in blocking the vitamin K dependant maturation of a physiological inhibitor of calcification, MGP, with warfarin, while preventing the rats from bleeding with the concomitant injection of Vitamin K1. With this model, we obtain an elevation of vascular calcification, collagen content and vascular stiffening within 4 weeks of treatments.

TG2 is involved in vascular calcification and collagen accumulation. These phenomena are known to cause arterial stiffening and occur in ISH. Therefore, our working hypothesis is that TG2 is involved in the stiffening of large arteries associated with ISH. Interrogation of the putative role of TG2 in arterial rigidification requires a sensitive method for detecting active TG2 in samples of arterial tissue. To that end, we have designed substrate analogue probes that are capable of reacting with TG2, leading to its efficient fluorescent labeling. Furthermore, the use of one of these probes (**1**, Figure 2) in a rat ISH model allows an association to be made between TG2 activity and arterial rigidification.

Figure 2 Rhodamine probe **1** used in this work, based on previously reported irreversible inhibitors **2** (de Macédo et al., 2002) and **3** (Pinkas et al., 2007)



Results and Discussion

Probe design and synthesis

Many irreversible inhibitors of TG2 have been developed, based on a simple dipeptidic scaffold resembling the commonly used acyl-donor substrate, Cbz-Gln-Gly, (Folk and Chung, 1985) bearing a reactive electrophilic group such as dihydroisoxazole, (Choi et al., 2005) thiadiazole, (Marrano et al., 2001), epoxide, (Marrano et al., 2001) chloroacetamide, (Pardin et al., 2006) maleimide, (Halim et al., 2007) or α,β -unsaturated amide (de Macédo et al., 2002). These amides are among the most potent irreversible TGase inhibitors, having $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ values exceeding $10^6 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$, attesting to the reactivity of an acrylamide group properly positioned in the TG2 active site. In a series of dipeptide acrylamide inhibitors we have previously examined the effect of the length of the acrylamide-bearing side-chain. This study convincingly demonstrated the superior reactivity and affinity of the dipeptide whose side-chain comprises four methylene units, in ϵ -N-acryloyl lysine derivative **2** (Figure 2).

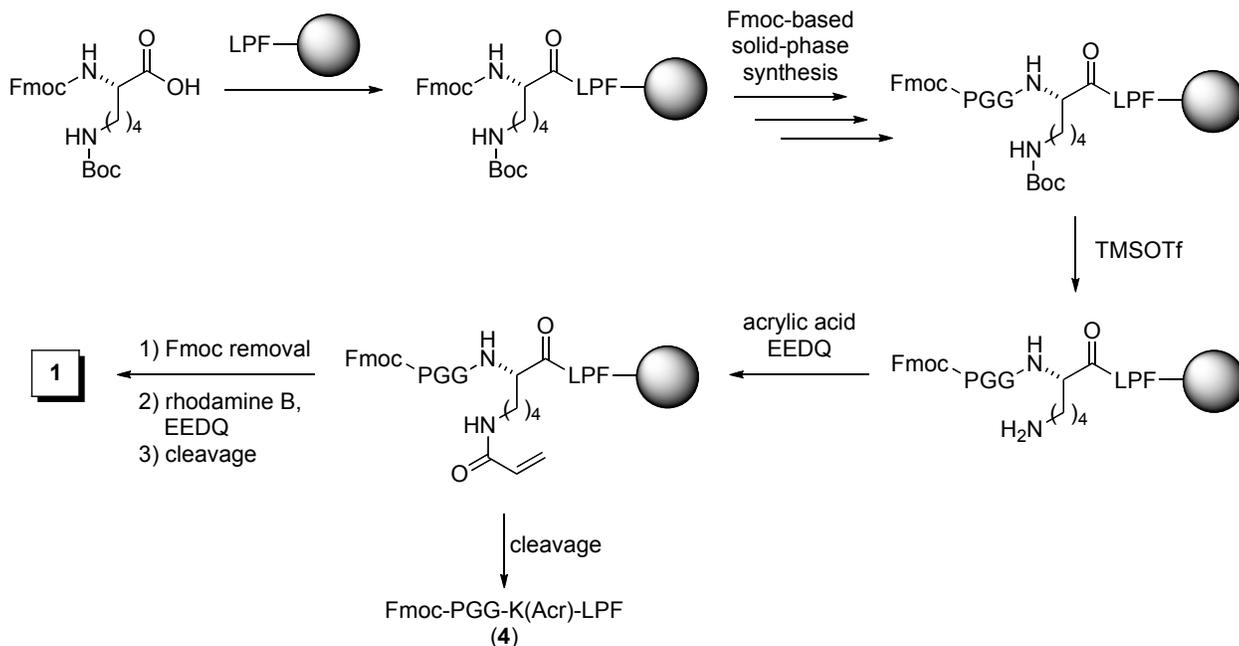
In order to be useful as a specific activity probe, an irreversible inhibitor must be selective for its target enzyme. In this light, we designed a probe based on an extended peptide sequence that should show high affinity and selectivity for TG2. Our preliminary efforts to this end consisted of a simple sequence alignment of native proteins known to serve as high-affinity substrates for TG2. Namely, flanking amino acid sequences were compared between the glutamine-donor substrates pro-elafin peptide (Sohn et al., 2003) (KVLDGQDP) and gliadin peptide (Hausch et al., 2003) (PQPQLPY). We reasoned that the sequence PNPQLPF should confer excellent affinity for TG2, while presenting only one

reactive Gln residue, potentially simplifying subsequent analyses. Interestingly, this sequence was found to conform roughly to the patterns predicted by Fésüs (Keresztessy et al., 2006) and Hitomi (Sugimura et al., 2006), upon analysis of TG2 reactivity with libraries of phage-displayed peptides. Our PNPQLPF sequence was then validated for *in vivo* reactivity by Ting and co-workers, who used it as a donor-substrate sequence in a TG2-mediated cell-surface labelling application (Lin et al., 2006). Finally, it is important to note the success that Khosla and co-workers have achieved with this approach (Hausch et al., 2003). By inserting a 6-diazo-5-oxo-norleucine (DON) residue in the place of the second, reactive Gln residue in a high-affinity sequence based on a gliadin peptide, they designed the extended peptidic inhibitor Ac-PQP-DON-LPF-NH₂ (**3**, Figure 2) that reacts as efficiently as any small molecule inhibitor ($k_{\text{inact}}/K_{\text{I}} = 2.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$). More recently, Khosla and co-workers have shown (Pinkas et al., 2007) that a truncated version of this inhibitor, namely Ac-P-DON-LPF-NH₂, reacts even more efficiently ($k_{\text{inact}}/K_{\text{I}} = 8.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$).

Rhodamine B was chosen as a fluorophore for conjugation to the peptidic inhibitor sequence due to its high quantum yield and red emission, easily distinguishable from intrinsic cellular fluorescence. Furthermore, free rhodamine B is affordable and its incorporation into a peptide sequence can be achieved through straightforward coupling procedures. In order to ensure that the fluorophore does not decrease the affinity of the peptide sequence for TG2, and that the adjacent peptide does not quench the fluorescence of the fluorophore, it was deemed necessary to attach the rhodamine to the peptide sequence through a spacer moiety. It has been reported that secondary amides of

rhodamine are less fluorescent than their parent acid, presumably due to lactamisation. For this reason, the rhodamine moiety of inhibitor **1** was attached to the peptide sequence through a tertiary amide linkage with a proline residue. The non-fluorescent control compound **4** (Figure 3) was designed according to the same criteria, having the same reactive electrophile, substrate peptide sequence and spacer sequence as inhibitor **1**, but lacking the rhodamine B fluorophore.

Figure 3 Solid-phase synthesis of rhodamine labeling agent **1** and control compound **4**



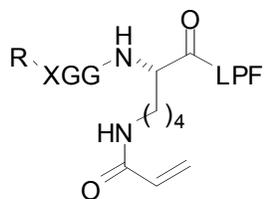
To facilitate the preparation of these labelling agents, a strategy was developed to allow their synthesis on solid-support (Figure 3). In general the devised synthetic route follows typical Fmoc-based peptide synthesis using Wang resin. Notably, the approach shown in Figure 3 allows the acryloyl group to be added to the ϵ -amino group of the Lys

residue, without requiring cleavage from the resin. α -N-Fmoc- ϵ -N-Boc-protected Lys was first prepared from a known protocol (Albericio et al., 1990) and then added to the resin-bound LPF tripeptide. Removal of the Boc group from the side-chain of the doubly protected residue, without cleavage from the resin, was critical to this approach. This was achieved using TMSOTf, according to the procedure published by Lejeune *et al.* (Lejeune et al., 2003). The acryloyl group was then added using acrylic acid and the coupling agent EEDQ, in the absence of base. These conditions were found to be superior to addition of acrylic anhydride, for example, giving an excellent yield without degradation of the electrophilic acryloyl group. Our procedure for Fmoc-based peptide coupling did not affect the integrity of the acryloyl group either, allowing a peptide spacer sequence to be added subsequently. Finally, the rhodamine fluorophore was added to the *N*-terminal of the peptide chain in excellent yield, using the same mild coupling conditions as for the addition of the acryloyl group. After cleavage from the resin, peptides were purified by preparative HPLC prior to kinetic evaluation or application.

The effect of the spacer sequence on the fluorescence of the rhodamine probe was also studied. Two additional probes were prepared, where the *N*-terminal proline residue of peptides **1** and **4** was replaced with glycine, resulting in peptides having spacer sequences GGG and numbered **5** and **6**, respectively (Table 1). The fluorescence of probe **1**, having a tertiary amide rhodamine linkage, was found to be comparable to free rhodamine B. However, peptide **5**, wherein the rhodamine moiety is attached to the peptide through a secondary amide, was found to be 13-fold less fluorescent. This is consistent with the

putative formation of a lactam isomer having a significantly lower quantum yield (Adamczyk and Grote, 2000).

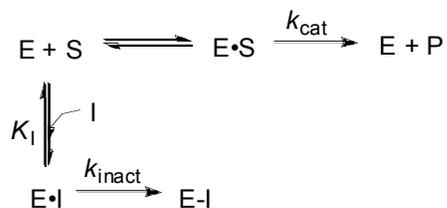
Finally, a negative control compound was prepared, bearing a rhodamine B moiety, but with a glycine residue in the place of the electrophilic acryloyl-lysine residue. This control compound (RhodB-PGG-G-LPF-OH, **7**) was synthesized on solid support according to methods similar to those shown in Figure 3 (see Experimental).

Table 1 Kinetic parameters measured for TG2 affinity labels studied herein:

Compound	R =	X =	k_{inact} (min^{-1})	K_{I} (μM)	$k_{\text{inact}} / K_{\text{I}}$ ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$) ¹⁾
1	rhodamine B	Pro	0.68 ± 0.20	79 ± 44	0.009 ± 0.008
4	Fmoc	Pro	0.46 ± 0.08	42 ± 17	0.011 ± 0.006
5	rhodamine B	Gly	0.19 ± 0.02	6 ± 2	0.032 ± 0.014
6	Fmoc	Gly	0.36 ± 0.06	22 ± 8	0.016 ± 0.008

Kinetic characterization

The affinity and reactivity of our probes were then determined *in vitro*. The reaction of recombinant guinea pig liver TG2, expressed and purified according to a published procedure (Gillet et al., 2004), with a chromogenic dipeptide substrate (de Macédo et al., 2000) showed a mono-exponential decrease in rate upon addition of peptidic inhibitors studied herein, consistent with the simplified kinetic scheme shown as Figure 4. First order rate constants were measured for this loss of activity, and fitted as a function of varied inhibitor concentration, taking into account the observed protection offered by the presence of substrate (see Figure 4 and equation 1 in Experimental Section). The kinetic parameters thus measured for the peptidic inhibitors studied herein are shown in Table 1.

Figure 4 Kinetic scheme for irreversible inhibition in presence of substrate

From Table 1 it would appear that peptides **5** and **6**, having lower K_I values than their respective counterparts **1** and **4**, may be bound more tightly by TG2. Perhaps the GGG spacer sequence, being more conformationally mobile than the PGG spacer, allows for better placement of the bulky Fmoc or rhodamine groups. However, this improved binding does not result in significantly improved reactivity, since all of the probes studied have comparable overall efficiency ratios (k_{inact}/K_I). These efficiency ratios are lower than those of the most efficient peptidic irreversible inhibitors (Hausch et al., 2003, Pinkas et al., 2007), but they are as high (Pardin et al., 2006) or higher (Halim et al., 2007) than those of many other irreversible inhibitors, suggesting peptide **1** may be used effectively as a useful fluorescent probe for TG2 activity.

Labeling selectivity

Ultimately, for compound **1** to be most useful as a probe, it should ideally be selective for TG2. In particular, it is important to distinguish between the activities of transglutaminases TG2 and Factor XIIIa. As described above, the peptide sequence of **1** was designed to display affinity for TG2 and to be less reactive with Factor XIIIa,

according to previously reported observed sequence specificities (Sugimura et al., 2006). The targeted selectivity was evaluated by incubating probe **1** with purified TG2 and with commercial Factor XIIIa, followed by visualization of fluorescent labeling by SDS-PAGE. As shown in Figure 5, probe **1** does not react significantly with Factor XIIIa (Figure 5A) but it reacts strongly with TG2 (Figure 5B), as intended. Furthermore, no reaction with TG2 was detected in the absence of added calcium, (Figure 5C) confirming that the labeling reaction was indeed dependent on the native, calcium-dependent TG2 reaction.

Figure 5 SDS-PAGE analysis of labeling selectivity

Incubation of activated Factor XIIIa with compound **1** (30 min, 37 °C) reveals no fluorescent labeling (Lane A), whereas incubation with TG2 results in strong fluorescent labeling (Lane B), but not in the absence of added calcium (Lane C). See Experimental Section for details.

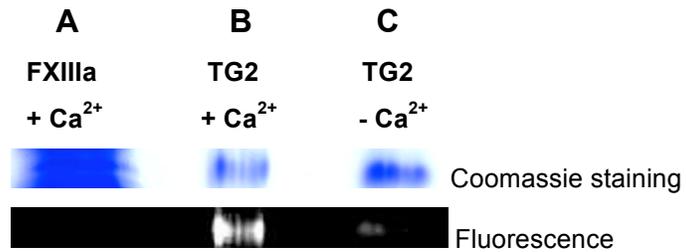
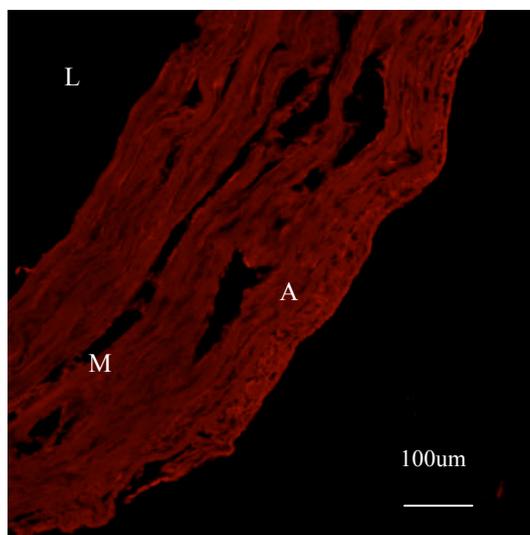
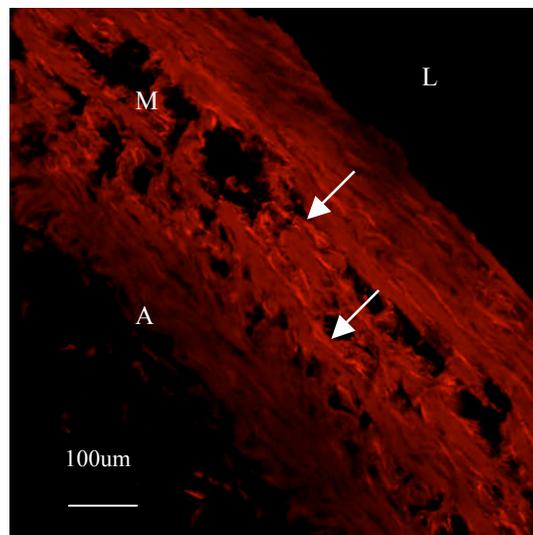


Figure 6 : Staining of aortic tissues using irreversible TG2 inhibitors as fluorescent probes on control rats (A), WVK1 rats (B), WVK2 rats (C), WVK3 rats (D) and WVK4 rats (E). Negative control using compound 7 on WVK4 rats (F). Pre-incubation of compound 4 followed by incubation of compound 1 to determine the specificity of compound 1 staining on WVK4 rats (G). A represents the adventitia, L the lumen and M the media of the aortic wall. Arrows point to areas of TG2 fluorescence.

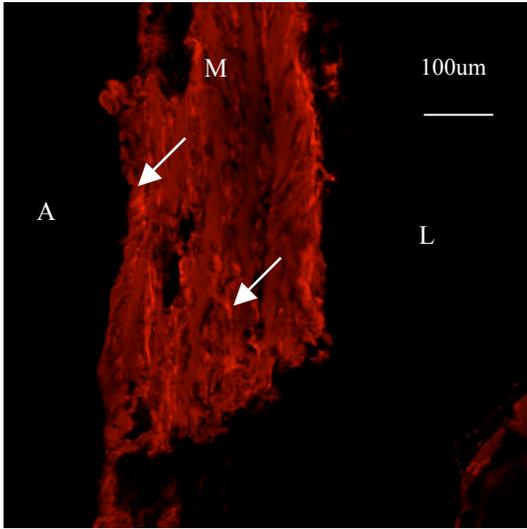
A



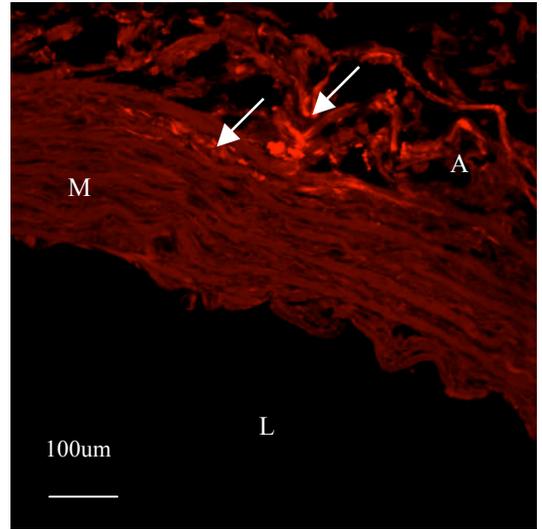
B



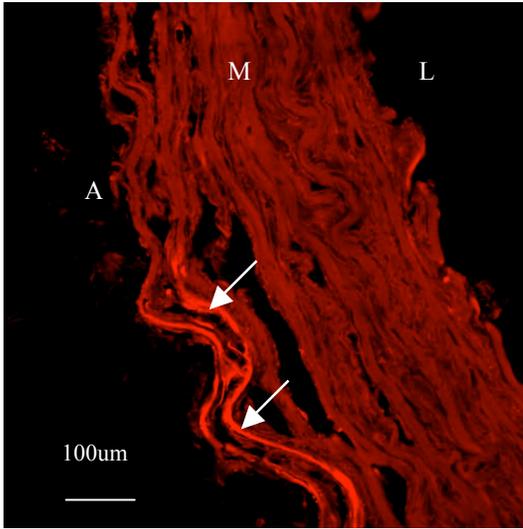
C



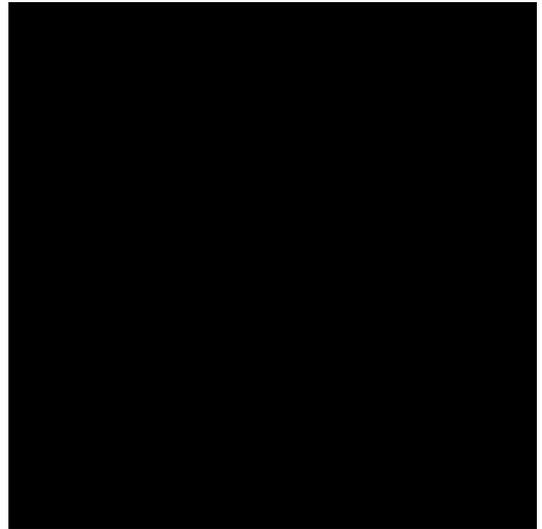
D



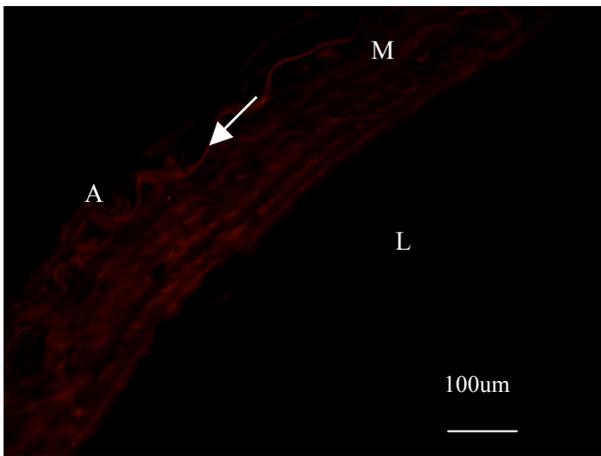
E



F



G



Tissue staining and Biological implication

In our model of ISH, arterial stiffness appears between the 3rd and 4th week of warfarin/vitamin K treatment (Essalihi et al., 2007). Indeed, calcification is usually increased first, followed closely by fibrosis, which leads to the stiffening of the artery. Therefore, we stained aortic tissue sections obtained from rats receiving this treatment for 1, 2, 3 and 4 weeks, while controls remained untreated. We first investigated control tissues, where no specific fluorescence could be detected using compound **1** as a probe (Figure 6A). At 1 and 2 weeks of treatment (WVK1 and WVK2), some staining could be detected between the elastic lamellae of the aortic wall (Figure 6B and C). After three weeks of treatment (WVK3), we observed an interesting phenomenon. Indeed, aortic staining seemed to have moved from between elastic lamellae in the media of the artery to areas of undulated elastic lamellae present in the outer media, adjacent to the adventitia (Figure 6D). As we have shown previously, these regions correspond to areas of calcification, where elastic lamellae are fixed by hydroxyapatite crystals into an undulated form, as detected by Von Kossa staining (Essalihi et al., 2005). This is also where fibrosis first appears when we stain these sections for collagen (Essalihi et al., 2007). Furthermore, at 4 weeks of treatment (WVK4), where calcification is at its maximum, but also when fibrosis is significantly elevated in the vascular wall (Essalihi et al., 2007), TG2 staining with compound **1** was now strictly associated with these undulated, calcified areas (Figure 6E). This suggests an association between calcification and transglutaminase activity. Looking at the literature, we have no doubt that the role played by TG2 in these areas is pro-calcifying and pro-fibrotic by nature. However, further studies are necessary to

confirm what is, at this point, only hypothetical in this model. To make sure that rhodamine was not staining the tissue non-specifically, we used a control compound, **7**, that is coupled to rhodamine but does not react with TG2. When aortic sections were incubated with this compound, we did not detect any fluorescence (Figure 6F). Furthermore, to test for the specificity of compound **1**, we pre-incubated the sections with control compound **4**, which binds to TG2 but is not coupled to rhodamine. This allowed us to saturate the binding sites of compound **1** on active TG2. We then incubated the sections with compound **1** and did not detect significant fluorescence (Figure 6G) relative to sections treated only with compound **1**, indicative of the specificity of the staining method.

Therefore, we could detect an increased TG2 activity after as little as one week of treatment. Increasing the duration of treatment led to a staining pattern that was associated with areas of calcification and fibrosis. This suggests that TG2 activity is increased during the process of calcification and fibrosis associated with arterial stiffness and ISH. In future work, it would be interesting to use these same irreversible inhibitors in the context of ISH, but as blocking agents rather than probes, to measure their impact on calcification, fibrosis and arterial stiffness.

Significance

New fluorescent irreversible inhibitors were designed as labeling agents for TG2. These inhibitors were based on a peptidic sequence designed to confer affinity for TG2 and selectivity over Factor XIIIa, as demonstrated by SDS-PAGE. As such, these inhibitors may be useful for ‘chemical knockout’ experiments intended to distinguish the biological

activities of the two closely related transglutaminases. The fluorescence of the inhibitors presented herein was also optimized with respect to the spacer fragment that links the rhodamine B fluorophore to the peptide sequence. The most fluorescent inhibitor was then used to probe TG2 activity in a WVK rat model for ISH. Fluorescent staining of aortic tissue revealed that over a four week period, TG2 activity increases in parallel with arterial stiffness, suggesting an association between TG2 activity and arterial rigidification.

Experimental

General synthesis

All Fmoc-protected amino acids, resins and coupling reagents were purchased from GL Biochem; Wang resin was purchased from NovaBiochem. All other reagents were obtained from Sigma-Aldrich. Reactions requiring anhydrous conditions were carried out under a dry nitrogen atmosphere employing conventional benchtop techniques. ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded on AMXR400 and AMX300 spectrometers and were referenced to the residual proton or ^{13}C signal of the solvent. Mass spectra were determined by FAB+ ionisation on an AutoSpec Q spectrometer at the Regional Mass Spectrometry Centre at the Université de Montréal.

Reactor tubes for solid-phase peptide synthesis were obtained from Supelco and shaking was performed on a shaker. All resins were swelled in DMF and washing steps were performed using CH_2Cl_2 and DMF (EMD Chemicals). Purification of all peptides was performed using a preparative HPLC method. Mass spectral data (MS, LCMS) were obtained using two different columns - column A : Gemini C18, 150×4.6 mm, 5m (Phenomenex, Torrance, CA); column B : Synergi Polar-RP, 150×4.6 mm, 4m (Phenomenex, Torrance, CA). Crude peptides were purified using a preparative Synergi Polar-RP, 100×21.20 mm column (Phenomenex, Torrance, CA) on a Varian (Prep Star) HPLC system at the Regional Mass Spectrometry Centre at the Université de Montréal.

General procedure for Fmoc peptide synthesis of irreversible inhibitors :

All peptides were synthesized using standard solid phase Fmoc chemistry. Briefly, the first Fmoc protected amino acid (5.5 mmol) was coupled to Wang resin (1.1 mmol) using DIC (5.5 mmol) and DMAP (0.11 mmol) in DMF (5 resin volumes). The level of loading of the amino acid on the resin after the first coupling step was determined by spectroscopic measurement of the UV absorbance of the piperidine dibenzofulvalene adduct formed during Fmoc deprotection. This loading level was used as the resin loading capacity for all subsequent steps. The remaining free hydroxyl functionalities were capped by treating the resin with a mixture of acetic anhydride/pyridine (2:3) followed by shaking for 2 h. After washing with DMF (3 times with 10 resin volumes) and DCM (3 times with 10 resin volumes) and ether (3 times with 10 resin volumes), the Fmoc group was removed by incubating three times with piperidine in DMF (20% v/v; 10 resin volumes) for 5 min, followed by washing with DMF (3 times with 10 resin volumes), DCM (3 times with 10 resin volumes) and ether (3 times with 10 resin volumes) in preparation for the next amide coupling. Deprotection was verified by a positive Kaiser test on a sample of a few beads. Then each Fmoc protected amino acid (1.7 mmol) was coupled to Wang resin preloaded with the necessary carboxyl-terminal amino acid (0.68 mmol) in DMF (5 resin volumes) using HOBt (1.7 mmol) and DIC (1.7 mmol). This operation was performed twice for 30 min. Coupling was verified by negative Kaiser test on a sample of a few beads. The peptide was then cleaved from the resin (1 g) by incubating with TFA:DCM (1:1) for 2 hours. The peptide was precipitated from the cleavage solution using diethyl ether and hexane and its purity was determined by HPLC using two different columns - column A :

Gemini C18, 150 × 4.6 mm, 5 μ (Phenomenex, Torrance, CA), and column B : Synergi Polar-RP, 150 × 4.6 mm, 4 μ (Phenomenex, Torrance, CA). The crude peptide was purified using a preparative Synergi Polar-RP, 100 × 21.20 mm column (Phenomenex, Torrance, CA) on a Varian (Prep Star) HPLC system.

Boc deprotection protocol

To a reactor containing 1 g of the Wang resin supported Fmoc-peptide (0.68 mmol, according to the measured loading level), were added 30 mL of deprotection mixture, freshly prepared from 470 μ L TEA (2 eq.), 1.09 mL of TMSOTf (0.2 M) and 28.44 mL of anhydrous DCE. The resin was shaken for 10 min then filtered and washed with 5 × 5 mL of DCM, 2 × 5 mL of DIEA 10% in DCM, 3 × 5 mL of DCE. Deprotection was carried out for another 10 min with a fresh deprotection mixture. The resin was filtered then washed with 5 × 5 mL of DCM, 2 × 5 mL of DIEA 10% in DCM, 2 × 5 mL of DCM, 2 × 5 mL of DMF and 2 × 5 mL of Et₂O. Deprotection was verified by positive Kaiser test on a sample of a few beads.

Acrylation and Rhodamine B coupling protocol

To the Wang resin-supported peptide (1 g, 0.68 mmol), either Fmoc-protected in the case of acrylation or deprotected in the case of Rhodamine B coupling, swollen in anhydrous DCM (5 resin volumes), was added acrylic acid (1.7 mmol) and EEDQ (1.7 mmol). The reaction mixture was shaken for 1 hour, followed by washing with DMF (3 times with 10 resin

volumes), DCM (3 times with 10 resin volumes) and ether (3 times with 10 resin volumes). This operation was performed twice.

HPLC analysis and purification.

For HPLC analysis, the peptide was cleaved from the resin as described in **General procedure for Fmoc peptide synthesis**. The crude material was purified by preparative Synergi Polar-RP (100 × 21.20 mm) column, on a Varian (Prep Star) HPLC system using 80-95 % of MeOH in water as eluant, a flow rate of 8 mL/min and the detector set at 254 nm. The collected fractions were freeze-dried to give the peptide in the form of a powder. The areas under the peaks were determined using LC/MSD Chem Station (Agilent Technologies).

Synthesis of irreversible inhibitors

RhodamineB-prolinyl-glycinyl-glycinyl-lysiny(acryloyl)-leucinyl-prolinyl-phenylalaninate (1)

This peptide was cleaved from the resin and purified by preparative HPLC as described above. The collected fractions were freeze-dried to give the desired irreversible peptidic inhibitor **1** as a pink powder (overall yield: 10%; 98% purity by column A, 96% purity by column B) HRMS m/z (M+H⁺): calcd 1193.63938; found 1193.63908.

Fmoc-Prolinyl-glycinyl-glycinyl-lysiny(acryloyl)-leucinyl-prolinyl-phenylalaninate (4)

This peptide was cleaved from the resin and purified by preparative HPLC as described above. The collected fractions were freeze-dried to give the desired irreversible peptidic inhibitor **4** as a white powder (8% overall yield; 91% purity by column A, 90% purity by column B). HRMS m/z ($M+H^+$): calcd 991.49238; found 991.49072.

Fmoc-Glycinyl-glycinyl-glycinyl-lysiny(acryloyl)-leucinyl-prolinyl-phenylalaninate (5)

This peptide was cleaved from the resin and purified by preparative HPLC as described above. The collected fractions were freeze-dried to give the desired irreversible peptidic inhibitor **5** (6% of yield ; 98% purity by column A, 99.9 % purity by column B) as a white powder. HRMS m/z ($M+H^+$): calcd 951.46108; found 951.46215.

RhodamineB-glycinyl-glycinyl-glycinyl-lysiny(acryloyl)-leucinyl-prolinyl-phenylalaninate (6)

This peptide was cleaved from the resin and purified by preparative HPLC as described above. The collected fractions were freeze-dried to give the desired irreversible peptidic inhibitor **6** (yield : 10%; 81% purity by column A, 80% purity by column B) as a pink powder. HRMS m/z ($M+H^+$): calcd 1153.60808; found 1153.60589.

RhodamineB-prolinyl-glycinyl-glycinyl-glycinyl-leucinyl-prolinyl-phenylalaninylate

(7)

This peptide was cleaved from the resin and purified by preparative HPLC as described above. The collected fractions were freeze-dried to give the desired control probe **7** as a pink powder (yield : 30%; 99% purity by column A, 98% purity by column B). HRMS m/z ($M+H^+$): calcd 1068.55532; found 1068.55472.

Kinetic Methods for Irreversible Inhibition

All assays were performed in triplicate. Kinetic runs were recorded on a UV-visible spectrophotometer at 405 nm and 25 °C, in a buffer composed of 50 mM CaCl₂, 50 μM EDTA, and 0.1 M MOPS (pH 7.0). All aqueous solutions were prepared using deionized water. All kinetic assays were carried out using 900 μL of buffer, 50 μL of 0.15 mg/ mL TGase, 25 μL of the chromogenic substrate Cbz-Glu(γ -*p*-nitrophenyl ester)Gly (Leblanc et al., 2001) dissolved in DMF (54 μM, corresponding to 6-fold K_M) and 25 μL of inhibitor. Final concentrations of inhibitors ranged from 10 μM to the solubility limit of each compound. Stock solutions of the inhibitors were also prepared in DMF such that the final concentration of this co-solvent was constant at 5 % v/v. Kinetic runs were initiated by enzyme addition and evaluation was carried out by the method of Stone and Hofsteenge (Stone and Hofsteenge, 1985), as described previously (de Macédo et al., 2002, Marrano et al., 2001). Mono-exponential time-dependent inactivation was observed for all of the inhibitors studied herein. Observed first-order rate constants of inactivation were determined from non-linear regression, using a mono-exponential model. These rate

constants were in turn fit to equation 1 by non-linear regression, providing the kinetic parameters k_{inact} and K_I as defined in Figure 4 and shown in Table 1.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}}[\text{I}]}{[\text{I}] + K_I \left(1 + \frac{[\text{S}]}{K_M} \right)} \quad (\text{Eqn 1})$$

Enzyme Preparation

Recombinant guinea pig liver TG2 was over-expressed and purified from *E. coli* following our previously published procedure (Gillet et al., 2004). The purified TG2 solution used in all assays had a specific activity of 30 U/mg in 25 mM Tris–acetate (pH 7) according to the hydroxamate activity assay (Nemes et al., 2005) in which Cbz-L-Gln-Gly and hydroxylamine are used as acyl-donor and acyl-acceptor substrates respectively. Recombinant human TG2, used in the selectivity tests, was expressed and purified as reported previously (Piper et al., 2002). Its activity was verified using a previously reported chromogenic activity assay (Leblanc et al., 2001). Factor XIII was purchased from Zedira (Darmstadt, Germany). It was activated using thrombin and its activity verified by a fluorogenic assay, according to the supplier's protocols.

Selectivity Tests

Parallel incubation experiments were performed in three 1.5-mL Eppendorf tubes. To the first was added Factor XIII (3 mg/mL (activated with 0.3 NIH units of thrombin), in 56.8 mM Tris (pH 7.5), 11.36 mM CaCl₂, 113.6 mM NaCl, 0.113% w/v PEG 8000, 5.68 mM GlyOMe•HCl, 5.68 mg/L hexadimethrine bromide, and compound **1** (90 µM dissolved in DMF, 0.9% final vol/vol). To the second was added human TG2 (0.868 mg/mL in 25 mM Tris (pH 7.2), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP) in the presence of calcium (0.6 M) and compound **1** (90 µM dissolved in DMF, 0.9 % final vol/vol). The third tube was identical to the second, but with 5 mM EDTA and no added calcium. All three tubes were incubated for 30 minutes at 37 °C, then analysed by 10% SDS-PAGE. The resulting gel was exposed under a trans-UV lamp to determine fluorescent labeling and then stained with Coomassie blue to reveal protein.

Animal Treatments

Male Wistar rats weighing 175 to 200 g (n = 9 per group) were obtained from Charles River Breeding Laboratories (St-Constant, Qc, Canada). They received warfarin (20mg/kg/day in drinking water) and vitamin K (phyloquinone, 15mg/kg/day sc injection) (WVK) during 1, 2, 3 and 4 weeks. Dosages were adjusted every second day. Control rats consisted of age-matched untreated rats (Ctrl). All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal.

Tissue preparation

Animals were sacrificed with a lethal dose of pentobarbital (65 mg/kg) and the aorta was harvested. A small section (0.5 – 1cm) of aorta was frozen at -80°C in Tissue-Tek OCT compound, (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, USA). These aorta sections were later cut into 10- μ m thick cryosections with a cryostat (Leica Microsystems, model CM3050S, Richmond Hill, ON, Canada), collected on Colorfrost/Plus Microscope slides (Fisher scientific, Ottawa, ON, Canada) and kept at -20°C.

Tissue staining

Tissue slides were allowed to thaw at room temperature for 20 minutes. OCT was removed and tissues permeabilized in PBS containing 0.1% triton for 20 minutes. Tissue sections were then circled using an ImmEdge PEN (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A 1 mM solution of compound **1** was prepared in a buffer containing 0.1 M Tris HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl and 5 mM CaCl₂ and applied to the tissue sections for 15 minutes at 37 °C. Slides were then rinsed 4 times (5 minutes each) under agitation in PBS. After rinsing in distilled water for 5 minutes, slides were dried briefly before applying a solution of Mowiol/*p*-phenylenediamine (9:1 vol/vol) (Calbiochem, San Diego, CA, USA and Sigma-Aldrich, Canada, respectively) to prevent bleaching. As a negative control, we applied 1 mM of an inactive form of the inhibitor, compound **7**, that is also coupled to rhodamine. Furthermore, to make sure that compound **1** does not bind non-specifically in the tissue, we applied 5 mM control compound **4**, an irreversible inhibitor that is not coupled to

rhodamine, for 45 minutes at 37 °C, before applying 1 mM of the normal rhodamine-coupled inhibitor (**1**), to the same section. Since compound **1** binds to the active form of TG2, fluorescence was evaluated as an index of TG2 activity. To do so, slides were photographed with a fluorescent microscope (Axioskop 40, Carl Zeiss Canada Ltd, Toronto, ON with SPOT RT Slider, Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI).

References

- Achyuthan, K.E., Slaughter, T.F., Santiago, M.A., Enghild, J.J., and Greenberg, C.S. (1993). Factor XIIIa-derived peptides inhibit transglutaminase activity. Localization of substrate recognition sites. *J. Biol. Chem.* *268*, 21284-21292.
- Adameczyk, M., and Grote, J. (2000). Efficient synthesis of rhodamine conjugates through the 2'-position. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *10*, 1539-1541.
- Aeschlimann, D., and Thomazy, V. (2000). Protein crosslinking in assembly and remodeling of extracellular matrices: the role of transglutaminase. *Connect Tissue Res* *41*, 1-27.
- Albericio, F., Nicolas, E., Rizo, J., Ruiz-Gayo, M., Pedroso, E., and Giralt, E. (1990). Convenient syntheses of fluorenylmethyl-based side chain derivatives of glutamic and aspartic acids, lysine, and cysteine. *2*, 119-122.
- Arribas, S.M., Hinek, A., and Gonzalez, M.C. (2006). Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther* *111*, 771-791.
- Azari, P., Rahim, I., and Clarkson, D.P. (1981). Transglutaminase activity in normal and hereditary cataractous rat lens and its partial purification. *Curr Eye Res* *1*, 463-469.
- Birckbichler, P.J., Orr, G.R., Patterson, M.K., Conway, E., Carter, H.A., and Maxwell, M.D. (1983). Enhanced transglutaminase activity in transformed human lung fibroblast cells after exposure to sodium butyrate. *Biochim. Biophys. Acta* *763*, 27.
- Bouvet, C., Moreau, S., Blanchette, J., de Blois, D., and Moreau, P. (2008). Sequential activation of matrix metalloproteinase 9 and transforming growth factor beta in arterial elastocalcinosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *28*, 856-862.

- Bruel, A., Ortoft, G., and Oxlund, H. (1998). Inhibition of cross-links in collagen is associated with reduced stiffness of the aorta in young rats. *Atherosclerosis* *140*, 135-145.
- Choi, K., Siegel, M., Piper, J.L., Yuan, L., Cho, E., Strnad, P., Omary, B., Rich, K.M., and Khosla, C. (2005). Chemistry and biology of dihydroisoxazole derivatives: selective inhibitors of human transglutaminase 2. *Chem Biol.* *12*, 469-475.
- Davies, P.J.A., Davies, D.R., Levitzki, A., Maxfield, F.R., Milhaud, P., Willingham, M.C., and Pastan, I.H. (1980). Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin and polypeptide hormones. *Nature (London)* *283*, 162.
- de Macédo, P., Marrano, C., and Keillor, J.W. (2000). A Direct and Continuous Spectrophotometric Assay for Transglutaminase Mediated Transpeptidation Activity. *Anal. Biochem.* *285*, 16-20.
- de Macédo, P., Marrano, C., and Keillor, J.W. (2002). Synthesis of Dipeptide-Bound Epoxides and α,β -Unsaturated Amides as Potential Irreversible Transglutaminase Inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem.* *10*, 355-360.
- De Young, L., Ballaron, S., and Epstein, W. (1984). Transglutaminase activity in human and rabbit ear comedogenesis: a histochemical study. *J. Invest. Dermatol.* *82*, 275.
- Dedeoglu, A., Kubilus, J.K., Jeitner, T.M., Matson, S.A., Bogdanov, M., Kowall, N.W., Matson, W.R., Cooper, A.J., Ratan, R.R., Beal, M.F., Hersch, S.M., and Ferrante, R.J. (2002). Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's disease. *J Neurosci.* *22*, 8942-8950.

Essalihi, R., Dao, H.H., Gilbert, L.A., Bouvet, C., Semerjian, Y., McKee, M.D., and Moreau, P. (2005). Regression of medial elastocalcinosis in rat aorta: a new vascular function for carbonic anhydrase. *Circulation* *112*, 1628-1635.

Essalihi, R., Dao, H.H., Yamaguchi, N., and Moreau, P. (2003). A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens* *16*, 103-110.

Essalihi, R., Ouellette, V., Dao, H.H., McKee, M.D., and Moreau, P. (2004). Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during medial arterial calcification: a role for endothelin? *J Cardiovasc Pharmacol* *44 Suppl 1*, S147-150.

Essalihi, R., Zandvliet, M.L., Moreau, S., Gilbert, L.A., Bouvet, C., Lenoel, C., Nekka, F., McKee, M.D., and Moreau, P. (2007). Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens* *25*, 1879-1886.

Faverman, L., Mikhaylova, L., Malmquist, J., and Nurminskaya, M. (2008). Extracellular transglutaminase 2 activates beta-catenin signaling in calcifying vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* *582*, 1552-1557.

Fesus, L. (1982). Transglutaminase activation: significance with respect to immunologic phenomena. *Surv. Immunol. Res.* *1*, 297.

Fesus, L., Thomazy, V., and Falus, A. (1987). Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* *224*, 104.

Folk, J.E., and Chung, S.I. (1985). Transglutaminases. *Methods Enzymol.* *113*, 358-375.

- Folk, J.E., and Cole, P.W. (1966). Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity. *J. Biol. Chem.* *241*, 5518–5525.
- Gillet, S.M.F.G., Chica, R.A., Keillor, J.W., and Pelletier, J.N. (2004). Expression and rapid purification of highly active hexahistidine-tagged guinea pig liver transglutaminase. *Prot. Exp. Purif.* *33*, 256-264.
- Greenberg, C., Birchbichler, P., and Rice, R. (1991). Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.* *5*, 3071-3077.
- Griffin, M., Smith, L.L., and Wynne, J. (1979). Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. *Br. J. Exp. Pathol.* *60*, 653-661.
- Halim, D., Caron, K., and Keillor, J.W. (2007). Synthesis and Evaluation of Peptidic Maleimides as Transglutaminase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *17*, 305-308.
- Hausch, F., Halttunen, T., Maki, M., and Khosla, C. (2003). Design, synthesis, and evaluation of gluten peptide analogs as selective inhibitors of human tissue transglutaminase. *Chem.Biol.* *10*, 225-231.
- Ientile, R., Caccamo, D., and Griffin, M. (2007). Tissue transglutaminase and the stress response. *Amino Acids* *33*, 385-394.
- Johnson, C.P., Baugh, R., Wilson, C.A., and Burns, J. (2001). Age related changes in the tunica media of the vertebral artery: implications for the assessment of vessels injured by trauma. *J Clin Pathol* *54*, 139-145.

- Johnson, K.A., Polewski, M., and Terkeltaub, R.A. (2008). Transglutaminase 2 is central to induction of the arterial calcification program by smooth muscle cells. *Circ Res* *102*, 529-537.
- Johnson, T.S., Fisher, M., Haylor, J.L., Hau, Z., Skill, N.J., Jones, R., Saint, R., Coutts, I., Vickers, M.E., El Nahas, A.M., and Griffin, M. (2007). Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* *18*, 3078-3088.
- Johnson, T.S., Griffin, M., Thomas, G.L., Skill, J., Cox, A., Yang, B., Nicholas, B., Birckbichler, P.J., Muchaneta-Kubara, C., and Meguid El Nahas, A. (1997). The role of transglutaminase in the rat subtotal nephrectomy model of renal fibrosis. *J Clin Invest* *99*, 2950-2960.
- Kaartinen, M.T., Murshed, M., Karsenty, G., and McKee, M.D. (2007). Osteopontin upregulation and polymerization by transglutaminase 2 in calcified arteries of Matrix Gla protein-deficient mice. *J Histochem Cytochem* *55*, 375-386.
- Keresztessy, Z., Csósz, E., Hársfalvi, J., Csomós, K., Gray, J., Lightowers, R.N., Lakey, J.H., Balajthy, Z., and Fésüs, L. (2006). Phage display selection of efficient glutamine-donor substrate peptides for transglutaminase 2. *Protein Sci.* *15*, 2466-2480.
- Leblanc, A., Gravel, C., Labelle, J., and Keillor, J.W. (2001). Kinetic studies of guinea pig liver transglutaminase reveal a general-base-catalyzed deacylation mechanism. *Biochemistry* *40*, 8335-8342.
- Lejeune, V., Martinez, J., and Cavelier, F. (2003). Towards a selective Boc deprotection on acid cleavable Wang resin. *Tetrahedron Letters* *44*, 4757-4759.

- Lesort, M., Attanavanich, K., Zhang, J.W., and Johnson, G.V.W. (1998). Distinct nuclear localization and activity of tissue transglutaminase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 11991-11994.
- Levitzki, A., Willingham, M., and Pastan, I.H. (1980). Evidence for participation of transglutaminase in receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2706.
- Marrano, C., de Macédo, P., and Keillor, J. (2001). Evaluation of Novel Dipeptide-Bound α,β -Unsaturated Amides and Epoxides as Irreversible Inhibitors of Guinea Pig Liver Transglutaminase. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 1923-1928.
- Mastroberardino, P., Iannicola, C., Nardacci, R., Bernassola, F., De Laurenzi, V., Melino, G., Moreno, S., Pavone, F., Oliverio, S., Fesus, L., and Piacentini, M. (2002). "Tissue" transglutaminase ablation reduces neuronal death and prolongs survival in a mouse model of Huntington's disease. *Cell Death Differ* 9, 873-880.
- Mehta, K. (2009). Biological and therapeutic significance of tissue transglutaminase in pancreatic cancer. *Amino Acids* 36, 709-716.
- Nemes, Z., Petrovski, G., and Fésüs, L. (2005). Tools for the detection and quantitation of protein transglutamination. *Analytical Biochemistry* 342, 1-10.
- Norlund, M.A., Lee, J.M., Zainelli, G.M., and Muma, N.A. (1999). Elevated transglutaminase-induced bonds in PHF tau in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 851, 154.
- Pardin, C., Gillet, S.M.F.G., and Keillor, J.W. (2006). Synthesis and Evaluation of Peptidic Irreversible Inhibitors of Tissue Transglutaminase. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 8379-8385.
- Pinkas, D.M., Strop, P., Brunger, A.T., and Khosla, C. (2007). Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLoS Biol.* 5.

- Piper, J.L., Gray, G.M., and Khosla, C. (2002). High selectivity of human tissue transglutaminase for immunoactive gliadin peptides: implications for celiac sprue. *Biochemistry* *41*, 386-393.
- Safar, M.E., Levy, B.I., and Struijker-Boudier, H. (2003). Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases. *Circulation* *107*, 2864-2869.
- Schroeder, W.T., Thacher, S.M., Stewart-Galetka, S., Annarella, M., Chema, D., Siciliano, M.J., Davies, P.J.A., Tang, H.Y., Sowa, B.A., and Duvic, M. (1992). Type I keratinocyte transglutaminase: expression in human skin and psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *99*, 27-34.
- Schurgers, L.J., Cranenburg, E.C., and Vermeer, C. (2008). Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost* *100*, 593-603.
- Selkoe, D.J., Abraham, C., and Ihara, Y. (1982). Brain transglutaminase: in vitro crosslinking of human neurofilament proteins into insoluble polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *79*, 6070.
- Shanahan, C.M., Proudfoot, D., Tyson, K.L., Cary, N.R., Edmonds, M., and Weissberg, P.L. (2000). Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification. *Z Kardiol* *89 Suppl 2*, 63-68.
- Small, K., Feng, J.F., Lorenz, J., Donnelly, E.T., Yu, A., Im, M.J., Dorn, G.W., 2nd, and Liggett, S.B. (1999). Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophy phenotype independent of phospholipase C activation. *J Biol Chem* *274*, 21291-21296.

- Sohn, J., Kim, T., Young-Hee, Y., Kim, J., and Kim, S. (2003). Novel transglutaminase inhibitors reverse the inflammation of allergic conjunctivitis. *J. Clin. Invest.* *111*, 121-128.
- Stone, S.R., and Hofsteenge, J. (1985). Specificity of activated human protein C. *Biochem. J.* *230*, 497-500.
- Sugimura, Y., Hosono, M., Wada, F., Yoshimura, T., Maki, M., and Hitomi, K. (2006). Screening for the Preferred Substrate Sequence of Transglutaminase Using a Phage-displayed Peptide Library. *J. Biol. Chem.* *281*, 17699-17706.
- Lin, C.W., and Ting, A.Y. (2006). Transglutaminase-catalyzed site-specific conjugation of small-molecule probes to proteins in vitro and on the surface of living cells. *Journal of the American Chemical Society* *128*, 4542-4543.
- Zieman, S.J., Melenovsky, V., and Kass, D.A. (2005). Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *25*, 932-943.

Annexe 2: Liste des publications

Dao HH, Bouvet C, **Moreau S**, Beaucage P, Larivière R, Servant MJ, de Champlain J, Moreau P. *Endothelin is a dose-dependant trophic factor and a mitogen in small arteries in vivo*. Cardiovasc Res. 2006 Jul 1;71(1):61-8.

Bouvet C, Peeters W, **Moreau S**, DeBlois D, Moreau P. *A new rat model of diabetic macrovascular complication*. Cardiovasc Res. 2007 Feb 1; 73(3): 504-511.

Essalihi R, Zandvliet ML, **Moreau S**, Gilbert LA, Bouvet C, Lenoël C, Nekka F, McKee MD, Moreau P. *Distinct effects of amlodipine treatment on vascular elastocalcinosis and stiffness in a rat model of isolated systolic hypertension*. J Hyperten. 2007 Sep;25(9):1879-86.

Bouvet C, **Moreau S**, Blanchette J, DeBlois D, Moreau P. *Sequential activation of matrix metalloproteinase 9 and transforming growth factor β in arterial elastocalcinosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:856-862.

Céline Bouvet, Rachida Essalihi, Liz-Ann Gilbert, **Simon Moreau** and Pierre Moreau. *Arterial stiffness as a therapeutic target for isolated systolic hypertension: focus on vascular calcification and fibrosis*. Current Hypertension Reviews 2010; 6(1):20-31.

Chabot N, **Moreau S**, Mulani A, Moreau P and Keillor JW. *Fluorescent probes of tissue transglutaminase reveal its association with arterial stiffness*. Chemistry & Biology 2010, 17 (10) : 1143-1150.

Moreau S, Chabot N, Mulani A, Keillor JW and Moreau P. *Transglutaminase 2: A key element in the development of vascular calcification associated with isolated systolic hypertension*. In preparation 2010.